

Aus dem Centrum für Anatomie  
der Medizinischen Fakultät der Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

# **Beteiligung der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) an Immunregulation des zentralen Nervensystems**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor rerum medicarum (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät der Charité –  
Universitätsmedizin Berlin

Erik Kwidzinski

Dekan: Prof. Dr. med. Martin Paul

Gutachter: 1. Prof. Dr. med. I. Bechmann  
2. Prof. Dr. med. F. Paulsen  
3. Prof. Dr. G. M. Rune

eingereicht: 28. April 2005

Datum der Promotion: 27. Januar 2006

## Zusammenfassung

In Europa stellt die Multiple Sklerose (MS) die häufigste neuroimmunologische Erkrankung des zentralen Nervensystems (ZNS) dar. Relevante Daten zum Krankheitsverlauf der MS wurden durch Untersuchungen im Tiermodell der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) gewonnen. Dennoch ist bis heute nicht eindeutig geklärt, welche Mechanismen für den typischerweise schubförmigen Verlauf der Erkrankung verantwortlich sind. Nach gegenwärtigem Kenntnisstand wandern autoreaktive T-Zellen vom T-Helfer-1 (Th-1) Typ in das ZNS ein und lösen eine gegen Bestandteile der Markscheide gerichtete Entzündung aus. Aktivierte Th-1 Zellen exprimieren große Mengen des für sie typischen Zytokin Interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). Dieses proinflammatorische Signalmolekül induziert in zahlreichen Zelltypen die Expression des Tryptophan degradierenden Enzyms Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO). Seit 1998 ist bekannt, dass die Inhibition der IDO zu einer durch T-Zellen vermittelten Abstoßung allogener Feten führt. Diese immunregulatorische Funktion von IDO konnte auf den schnellen Abbau der essentiellen Aminosäure Tryptophan und der im folgenden Abbauweg synthetisierten T-Zell-toxischen Metabolite zurückgeführt werden. Da im entzündeten ZNS-Gewebe während der MS und der EAE das IDO induzierende Zytokin IFN- $\gamma$  ebenfalls exprimiert wird, sollte in der vorliegenden Arbeit untersucht werden in wie weit die IDO an der Immunregulation des ZNS unter autoimmuner Neuroinflammation während EAE, beteiligt ist.

Mittels HPLC konnte gezeigt werden, dass die relative IDO Aktivität im ZNS während der akuten und der Erholungsphase der Erkrankung signifikant gesteigert ist. Erfolgte ab dem Ausbruch der Erkrankung die systemische Inhibition der IDO Aktivität mit dem spezifischen IDO-Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan, so führte dies zu einer abgeschwächten Erholung und zu einer Verstärkung der folgenden Erkrankungsphase im Vergleich zu Kontrolltieren. Mittels Immunzytochemie konnte gezeigt werden, dass aktivierte Mikroglia IDO im entzündeten ZNS und in Zellkultur nach IFN- $\gamma$  Stimulation exprimieren. Aufgrund von RT-PCR Analysen weiterer am Tryptophanabbau beteiligter Enzyme konnte gezeigt werden, dass während EAE durch die Induktion der IDO der Kynureninweg aktiviert wird. Entlang dieses Stoffwechselweges werden T-zell-toxische Tryptophanmetabolite gebildet die an der Eliminierung autoreaktiver T-Zellen im ZNS während der Erholungsphase der EAE beteiligt sein könnten. Die gewonnen Daten legen nahe, dass aktivierte Th1 Zellen im ZNS einen negativen Rückkopplungsmechanismus auslösen, der ein Ausbreiten der Entzündung begrenzt und somit Folgeschäden im ZNS reduziert.

IDO, ZNS, EAE, Multiple Sklerose, Autoimmunität

## Abstract

Multiple sclerosis (MS) is the most widespread neuroimmunological disease of the central nervous system (CNS) in Europe. By applying the animal model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), important insights into the disease course of MS have been gained. However, it is still not clear which mechanisms are responsible for the typical relapsing-remitting form of the disease. At present it is accepted that at the onset of the disease myelin-reactive (autoreactive?) T helper type 1 (Th1) cells infiltrate the CNS and induce autoimmune neuroinflammation. Activated Th1 cells express high amounts of the cytokine interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ). This pro-inflammatory signaling molecule is known to induce the expression of the tryptophan-degrading enzyme Indoleamine 2,3- Dioxygenase (IDO) in several cell types. Since 1998 it is known that inhibition of IDO induces the T cell-mediated rejection of allogeneic concepti in mice. The mechanism of this immunoregulatory function of IDO was shown to be due to the degradation of the essential amino acid tryptophan and the subsequent synthesis of T cell toxic metabolites. Since the IDO-inducing cytokine IFN- $\gamma$  is also expressed within inflamed CNS tissue during MS and EAE, the present work investigated the role of IDO in immunoregulation of the CNS during autoimmune neuroinflammation in the EAE model.

A significant increase in relative IDO activity within the CNS during the acute and remission phases of EAE was identified by HPLC analysis. Systemic inhibition of IDO activity by the specific IDO inhibitor 1-methyl-tryptophan reduced the remission and exacerbated the progression of the disease in comparison to control animals. Activated microglia were identified by immunocytochemistry as IDO-expressing cells within the acute inflamed CNS and in cell culture after IFN- $\gamma$  stimulation. Enzymes following IDO in the kynurenine pathway were shown by RT-PCR to be up-regulated in the disease course. The analyzed enzymes are known to produce T cell toxic tryptophan metabolites and might therefore be involved in the elimination of autoreactive T cells from CNS tissue. In conclusion, the presented data support the view that autoreactive (activated?) Th1 cells in the CNS induce a self-limiting negative feedback mechanism which limits the spread of inflammation, thereby reducing bystander damage in the CNS.

IDO, CNS, EAE, Multiple Sclerosis, autoimmunity

# Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	2
Abstract	3
Inhaltsverzeichnis	4
1 Einleitung	7
1.1 Das Immunprivileg	7
1.1.1 Das Immunsystem des zentralen Nervensystems	7
1.2 Antigen-präsentierende Zellen im ZNS	9
1.3 Die Multiple Sklerose und ihr Tiermodell, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	11
1.3.1 Die Multiple Sklerose	12
1.3.2 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis	13
1.3.3 Mikroglia in der MS und EAE	17
1.3.4 Astrozyten in der MS und EAE	17
1.4 Induzierter Tryptophandegradation als immunregulatorischer Mechanismus	18
1.4.1 Induktion der IDO durch IFN- $\gamma$	20
1.4.2 IDO während bakterieller Infektionen	20
1.4.3 IDO in der AIDS-Enzephalopathie	21
1.4.4 IDO als immunregulatorisches Enzym	21
2 Zielstellung und Projekthypothese	24
3 Material und Methoden	25
3.1 Präparation und Kultivierung primärer Zellkulturen	25
3.1.1 Primäre Astrozyten- und Mikroglia-kulturen	25
3.1.2 Primäre Neurone	26
3.2 Stimulation von Zellkulturen	26
3.3 Verwendete Nährmedien und Puffer	27
3.4 Messung der Stickstoffmonoxyd (NO)-Produktion	28
3.5 Tierstämme und Haltung	28
3.6 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)	28

3.6.1	EAE Verlauf unter IDO Inhibition	29
3.7	Gewinnung von Gewebeproben	30
3.7.1	Transcardiale Perfusion	30
3.8	Molekularbiologische Methoden	30
3.8.1	Ribonukleinsäure (RNA) Isolation	30
3.8.2	Komplementäre DNA (cDNA) Synthese	31
3.8.3	Polymerase Kettenreaktion (PCR)	32
3.8.4	Real Time PCR	33
3.9	Biochemische Methoden	35
3.9.1	Protein Isolation und Western-Blot	35
3.9.1.1	Gewinnung der Proteinproben	35
3.9.1.2	Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Kit	35
3.9.1.3	Proteingelelektrophorese	35
3.9.1.4	Western-Blot	36
3.9.1.5	Immunodetektion auf Blotmembranen	37
3.10	IDO Aktivitätsnachweis mittels hochauflösender Flüssigkeits-Chromatographie	38
3.10.1	Aufarbeitung von Proben für die HPLC-Messung	38
3.10.1.1	Medien aus Zellkulturexperimenten	38
3.10.1.2	Gewebeproben	38
3.10.2	Quantitative Bestimmung von Tryptophan und Kynurenin mittels HPLC	39
3.11	Immunzytologie und Histologie	42
3.11.1	Vibratonschnitte	42
3.11.1.1	Paraffinschnitte	42
3.11.1.2	Entparaffinierung von Schnitten	42
3.11.2	Immunhistochemische Färbungen	42
3.11.3	Immunzytochemische Färbungen	42
4	Ergebnisse	45
4.1	IDO Aktivität während der EAE	45

4.1.1	IDO mRNA Expression während der EAE50	
4.2	Inhibition der IDO führt zu einer Verstärkung der EAE Erkrankung	51
4.3	Histologie der EAE und Nachweis IDO exprimierender Zellen im ZNS	54
4.4	Mikroglia und Astrozyten werden in vitro durch Zytokine stimuliert	58
4.5	Der Transkriptionsfaktor STAT1 wird in aktivierten Mikroglia und Astrozyten...	62
4.6	Interferon- $\gamma$ induziert die Bildung von IDO mRNA in primären Mikroglia und Astrozyten...	64
4.7	Immunzytologischer Nachweis von IDO in primären Zellkulturen	65
4.8	Quantitative RT-PCRs von an der EAE beteiligten Schlüssel Proteinen	69
4.8.1	IFN- $\gamma$ mRNA Synthese während der EAE	69
4.8.2	iNOS mRNA Synthese während der EAE	70
4.8.3	IL-10 mRNA Synthese während der EAE	70
4.9	Expression von Kynurinase und 3-Hydroxyanthranilat Oxidase in primärer Mikroglia...	71
4.10	mRNA Expression am Kynureninweg beteiligter Enzyme in der EAE	72
4.10.1	Kynurinase und 3-Hydroxyanthranilat Oxidase mRNA Expression während EAE	73
5	Diskussion	75
5.1	Übersicht der Ergebnisse	75
5.2	IDO wird im ZNS während der EAE exprimiert	75
5.3	IDO wird unter EAE von Makrophagen/Mikroglia im Rückenmark exprimiert	78
5.4	Mikroglia stellen <i>in vitro</i> eine Quelle ZNS spezifischer IDO Expression dar	79
5.5	Regulation der IDO durch Zytokinexpression in der EAE	80
5.6	Expression immunregulatorischer Enzyme des Kynureninweges <i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>	81
6	Zusammenfassung	82
	Abkürzungsverzeichnis	84
	Literaturverzeichnis	87
	Eigene Publikationen	103
	Lebenslauf	104
	Danksagung	105
	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG	106

# 1 Einleitung

## 1.1 Das Immunprivileg

Einige Organe des Körpers wie die vordere Augenkammer, das Gehirn, die Hoden und die Plazenta zeichnen sich durch eine reduzierte Aktivierbarkeit des spezifischen und unspezifischen Immunsystems aus (Medawar 1948, Streilein 1993), was als Immunprivileg bezeichnet wird. Als Folge werden allogene Transplantate verzögert in diesen Organen abgestoßen (Shirai 1921; Medawar 1948). Die Bedeutung des Immunprivilegs wird in der Plazenta deutlich, wo das mütterliche Immunsystem den zur Hälfte aus väterlichen Genen bestehenden, und somit immunologisch als allogenes Transplantat zu betrachtenden, Fötus nicht abstoßen darf. Die weiteren immunprivilegierten Organe zeichnen sich durch hochgradig differenzierte Gewebe mit relativ geringer Regenerationsfähigkeit aus. Im zentralen Nervensystems (ZNS) könnte der entzündungsbedingte Verlust nicht ersetzbarer Zellen zu motorischen und kognitiven Störungen, bis hin zum Tode führen. Im Hoden könnte der Verlust von Spermatogonien zur Zeugungsunfähigkeit führen. Daher stellt die Toleranz gegenüber körperfremden Antigenen einen notwendigen Mechanismus dar, um den Verlust von nicht ersetzbaren Zellen zu verhindern.

Unter pathologischen Bedingungen kann es zu Immunreaktionen gegen körpereigene Bestandteile kommen, die als Autoimmunerkrankungen bezeichnet werden. So richtet sich bei der Multiplen Sklerose das Immunsystem gegen Bestandteile der Myelinschicht des ZNS, was bei den Patienten zu massiven motorischen und kognitiven Störungen und zu einer starken psychischen Belastung auch im sozialen Umfeld der Erkrankten führt. Um Autoimmunerkrankungen wie die MS besser verstehen und behandeln zu können, ist es notwendig, die an der Erkrankung beteiligten Mechanismen sowohl auf zellulärer, als auch auf molekularer Ebene besser zu verstehen.

### 1.1.1 Das Immunsystem des zentralen Nervensystems

Lange wurde davon ausgegangen, dass Gewebetransplantate im ZNS länger überleben als in anderen Organen (Medawar, 1948), da im ZNS kein lymphatischer Abfluss nachweisbar war und die Blut-Hirn-Schranke die Infiltration von Immunzellen verhindern sollte. Ebenfalls konnte keine Expression des für eine Immunantwort notwendige Expression des Haupt-Histokompatibilitätskomplexes-II (MHC-II, „major histocompatibility complex-II“) nachgewiesen werden. Neuere Ergebnisse zeigten jedoch, dass Zellen im ZNS unter pathologischen Bedingungen MHC-II Antigene exprimieren (Bechmann et al., 2001A; Dong und Benveniste, 2001). Gewebetransplantate im ZNS lösen eine Abstoßungsreaktion aus, die jedoch langsamer vonstatten geht, als in anderen Organen (Alun Brown, 2001).

Eine lang akzeptierte Theorie für die Unterdrückung von Immunantworten auf körperfremde Antigene im ZNS geht davon aus, dass durch die Blut-Hirn-Schranke das ZNS Parenchym isoliert vom peripheren Immunsystem sei (Abbildung 1A). Lediglich lipophile Moleküle mit einer bestimmten Größe können aus der Blutzirkulation über das vaskuläre Epithel durch die Blut-Hirn-Schranke hindurch ins ZNS gelangen. Die „tight junctions“ zwischen den Endothelzellen verhindern eine Diffusion von Proteinen und anderen geladenen Molekülen durch den interzellularen Raum (Reese & Karnovsky, 1967). Alle vom ZNS benötigten Moleküle, die nicht durch die Blut-Hirn-Schranke diffundieren können, werden durch spezifische Transportermoleküle in das ZNS-Gewebe transportiert. Weiterhin ging man davon aus, dass Immunzellen nicht über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS gelang-

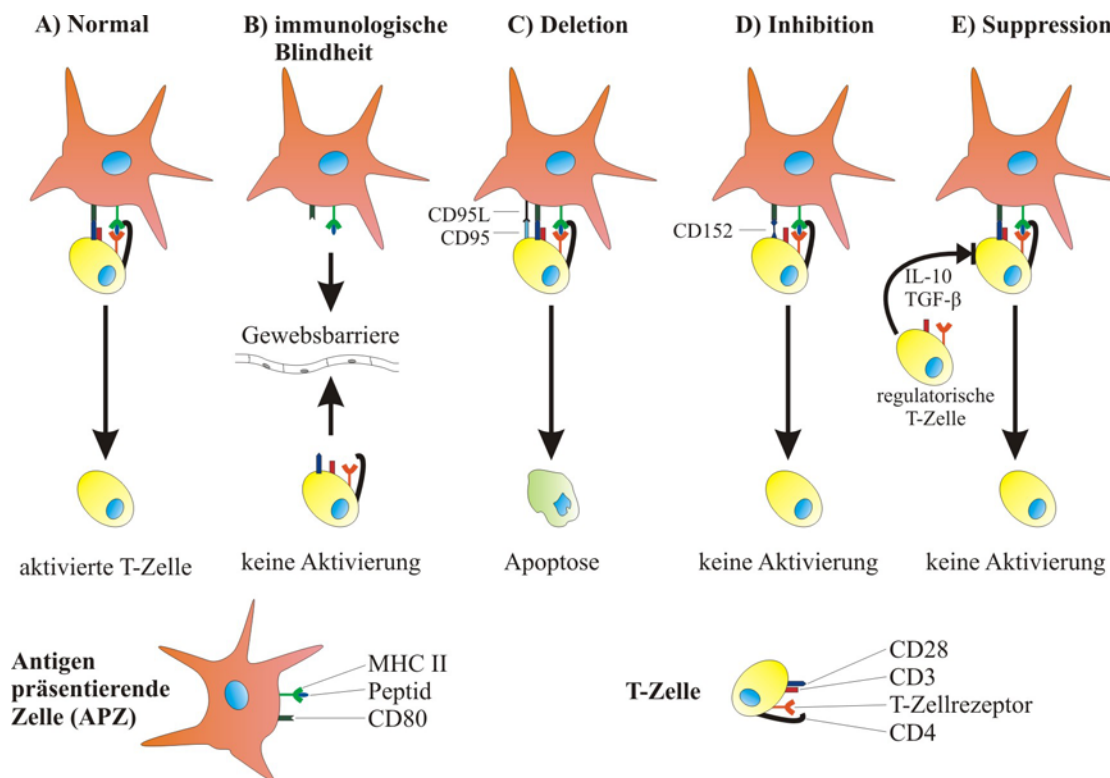
gen können. Diese Theorie konnte in den vergangenen Jahren zum Teil widerlegt werden. Aktivierte Leukozyten sind in der Lage, aktiv die Bluthirnschranke zu passieren und in das ZNS einzuwandern (Wekerle et al., 1987; Hickey et al., 1991; Alun Brown, 2001). Obwohl im ZNS keine Lymphgefäße vorliegen, erreichen Antigene von dort die zervikalen Lymphknoten durch Diffusion über die *Lamina Cribrosa* (Cserr und Knopf, 1992). Somit konnte gezeigt werden, dass die immunologische Blindheit des Immunsystems gegenüber dem ZNS nicht existiert, die beobachteten abgeschwächten Immunreaktionen sind vielmehr auf immunregulatorische Mechanismen im ZNS zurückzuführen (Kwidzinski et al., 2003). In zahlreichen Arbeiten konnten sowohl unter physiologischen, als auch unter pathologischen Bedingungen mehrere grundlegende Mechanismen solcher Toleranz-induzierender Mechanismen beschrieben werden (Abbildung 1).

Neben der klassischen Vorstellung der mechanischen Gewebsbarriere -im ZNS der Blut-Hirn-Schranke- wurde auch die Induktion von programmiertem Zelltod (Apoptose) in einwandernden potentiell schädlichen Leukozyten mittels Todesliganden wie CD95 Ligand (CD95L) oder Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) als Mechanismus zur Unterdrückung einer Immunantwort beschrieben (Abbildung 1B) (Bellgrau et al., 1995; Griffith et al., 1995, Bechmann et al., 1999; 2000; Bechmann und Nitsch 2001). Aktivierte T-Zellen exprimieren den Rezeptor CD95 (Alderson et al., 1994). Dieser Todesrezeptor auf den Leukozyten kann nach Bindung an seinen Liganden CD95L die Aktivierungs-induzierte Apoptose der Leukozyten auslösen. Dieser Todesligand wird nach Schädigung des ZNS auf Astrozyten exprimiert (Bechmann et al., 2000), was den apoptotischen Zelltod aktivierter T-Zellen zur Folge hat (Bechmann et al., 2002).

Ein weiterer immunregulatorischer Mechanismus basiert auf dem Vorhandensein regulatorischer CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> doppelt positiver T-Zellen. Diese Zellen bilden das anti-inflammatorische Interleukin-10 (IL 10) und den transformierenden Wachstumsfaktor- $\beta$  (TGF- $\beta$ : "transforming growth factor-  $\beta$ "), diese Botenstoffe reduzieren die klonale Expansion und Aktivierung autoreaktiver T-Zellen (Abbildung 1D).

Nach aktuellem Wissensstand geht man heute davon aus, dass Apoptoseinduktion, unvollständige- und inhibierende Kostimulation beziehungsweise die unvollständige Aktivierung antigenpräsentierender Zellen im ZNS (Carson et al., 1998) für die Unterdrückung von Entzündungen im ZNS verantwortlich sind.





**Abbildung 1: Schematische Darstellung Toleranz induzierender Mechanismen**

Während einer Inflammation wird der T-Zelle das phagozytierte Antigen (Peptid) über den Haupt-Histokompatibilitätskomplex-II (MHCII) von der antigenpräsentierenden Zelle präsentiert (A). Erkennt der T-Zellrezeptor das Antigen wird die T-Zelle aktiviert. Immunologische Blindheit kann teilweise durch eine Gewebsbarriere -wie zum Beispiel die Blut-Hirn-Schranke erreicht werden (B). Diese Barriere verhindert das Aufeinandertreffen von antigenpräsentierenden und T-Zellen und somit auch die Aktivierung von T-Zellen. Über die Entfernung infiltrierender T-Zellen kann eine Entzündung unterdrückt werden (C). So werden CD95 exprimierende aktivierte T-Zellen von CD95L positiven antigenpräsentierenden Zellen durch die Induktion von Apoptose entfernt. Die Aktivierung von T-Zellen wird durch die Bindung von CD152 an CD80 oder CD86 der antigenpräsentierenden Zelle inhibiert (D). Regulatorische T-Zellen können mittels Expression anti-inflammatorischer Botenstoffe (IL10 und TGF- $\beta$ ) T-Zellaktivierung behindern. Dies wird als Suppression bezeichnet (E). (verändert nach Kamradt und Mitchison 2002)

## 1.2 Antigen-präsentierende Zellen im ZNS

Neben infiltrierenden T-Lymphozyten können bei akuten Hirnschäden oder chronischen Erkrankungen aktivierte Blutleukozyten auch bei nicht geschädigter Blut-Hirn-Schranke in das Hirngewebe eindringen (Brown, 2001). Im ZNS selbst gibt es immunkompetente Zellen, die Gliazellen, von denen Astrozyten den größten Anteil und Mikroglia mit ungefähr 10 % (Altman, 1994) eine kleinere Zellpopulation darstellen. Die gehirnspezifischen Astrozyten und Mikroglia sind maßgeblich an den entzündlichen Vorgängen im Gehirn beteiligt. Lediglich Mikroglia besitzen jedoch voll-kompetente, immunologische Funktionen und stellen somit die residenten Makrophagen des Gehirns dar (Gehrmann et al., 1995; Benveniste, 1997).

Obwohl lange Zeit angenommen wurde, dass Mikroglia sich ebenfalls, wie alle anderen Zelltypen des Gehirns, aus dem Neuroektoderm ableiten (Kitamura et al., 1984; Hao et al., 1991; Richardson et al., 1993), geht man heute davon aus, dass sie mesodermalen Ursprungs sind. Dafür spricht, dass Mikroglia die meisten Oberflächenmoleküle mit peripheren Makrophagen gemein haben (Flaris et al., 1993), wodurch diese beiden Zelltypen schwer voneinander unterschieden werden können (Guillemin und Brew, 2004). Mikroglia wandern während der frühen postnatalen Phase über die Pia mater in das Gehirn (Ling & Wong, 1993) und verteilen sich dort. Diese früh postnatalen migratorischen Zellen besitzen eine nahezu runde Morphologie und werden auch als amöboide Mikroglia bezeichnet. Diese amöboide Mikroglia ist während der Entwicklung des ZNS an der Phagozytose von Zellüberresten beteiligt, die durch programmierten Zelltod oder Remodulation von Nervenverbindungen entstehen (Ling & Wong, 1993; Moore & Thanos, 1996). Die Mikroglia differenzieren zu der so genannten ruhenden Form und entwickeln mit zunehmenden Alter immer ausgeprägtere Ausläufer mit zahlreichen Verzweigungen. Diese Morphologie beschrieb Rio-Hortega mit dem Begriff „ramifiziert“ (Del Rio-Hortega, 1932). Die ramifizierte Form der Mikroglia im gesunden Gewebe wird als der immunologisch inaktive/ruhende Typ bezeichnet. Die Zellen zeigen eine geringe Dichte der charakteristischen Oberflächenmarker (Wu et al., 1994; Kreutzberg, 1996) und eine geringe Teilungsrate (Lawson et al., 1990). Mikroglia ist nicht wie von Rio-Hortega beschrieben (Del Rio-Hortega, 1932) gleichmäßig, sondern bei genauerer Betrachtung vielmehr heterogen im ZNS verteilt. Eine große Anzahl der Mikroglia sind in der Umgebung vom Zellkörper der Neuronen in der Grauen Substanz und zwischen Nervenfasern in der Weißen Substanz verteilt. In der Grauen Substanz befinden sich im Vergleich mit der Weißen Substanz mehr als fünf mal soviel Mikroglia (Lawson et al., 1990). Durch eine Verletzung oder pathologische Veränderung des Gehirngewebes verändert sich die Morphologie der Mikroglia (Streit et al., 1988; Gehrman et al., 1995). Es kommt zu einer Reduzierung der Ausläufer und zu einer Vergrößerung des Zellkörpers (Kreutzberg, 1996). Diese Aktivierung erfolgt abgestuft und ist weiterhin charakterisiert durch verstärkte Motilität, Zellteilung, Expression neuer funktioneller Antigene (Streit et al., 1988; Kreuzberg, 1996; Gehrman et al., 1995) sowie phagozytische Aktivität (Kreutzberg, 1996; Bechmann und Nitsch, 1997; Streit et al., 1999).

Aktivierte Mikroglia produzieren unter bestimmten Bedingungen zytotoxische Substanzen wie freie Sauerstoffradikale, Stickstoffmonoxid (NO), nicht-spezifische Proteasen und Zytokine (Giulian und Ingeman, 1988; Banati et al., 1993; Kreutzberg, 1996; Streit, 1996; Zielasek & Hartung, 1996). Die Zellen besitzen die Fähigkeit zur Antigenpräsentation im Kontext mit MHC II an der Zelloberfläche (Woodroffe et al., 1989; Hayes et al., 1987). Die zytotoxischen Substanzen schädigen neben fremden Pathogenen oder verletzten Zellen auch intakte Zellen (Streit & Kincaid Colton, 1995). Mikroglia reagieren als erste Zellen des ZNS auf jegliche neuronale Verletzung. Daher geht man davon aus, dass verletzte Neurone mit Mikroglia direkt kommunizieren können (Aschner et al., 1999, Streit et al., 1999). Die genauen Vorgänge der Signalereignisse die zur Aktivierung von Mikroglia führen, sowie der zelluläre Ursprung sind bisher weitgehend unbekannt. Es wird jedoch davon ausgegangen, dass Chemokine wie CCL21 hierbei eine wichtige Rolle spielen (Rappert et al., 2004).

Anhand von Knochenmark Chimären konnte in Mäusen gezeigt werden, dass nach mechanischer Schädigung des ZNS oder nach Schlaganfall aus dem transplantierten Knochenmark stammende mit dem für fluoreszierenden Protein (GFP) markierte Zellen in das Gehirnparenchym einwandern. Nach zwei Wochen ramifizieren diese Zellen und konnten mit den bisher bekannten Markern nicht von residenten Mikroglia unterschieden werden (Priller et al., 2001; Bechmann et al., 2005). Daher wird davon ausgegangen, dass der Pool von residenten Mikroglia nach Schädigung durch infiltrierende Makrophagen aufgefüllt wird.

Neben der Mikroglia als residenter Gehirnmakrophage im Neuropil kommen im ZNS perivaskuläre Makrophagen vor. Der perivaskuläre Raum, der die cerebralen- und Gehirnhaut-Blutgefäße umgibt, enthält diese Makrophagen ähnlichen perivaskulären Zellen. Es wird angenommen, dass diese Zellen eine wichtige Rolle unter pathologischen Bedingungen als Antigen-präsentierende Zellen spielen (Graeber et al., 1992, Weller, 1998). Perivaskuläre Makrophagen werden langsam, aber kontinuierlich, durch Knochenmarkzellen der Monozyten/Makrophagen Linie ersetzt (Lassmann et al., 1993, Bechmann et al., 1999; 2001B).

Astrozyten stellen eine weitere Gruppe von ZNS spezifischen an der Immunregulation beteiligten Zellen dar. In der Entwicklung entstehen aus neuronalen Stammzellen des Neuralrohres Gliastammzellen, die sich weiter zu Astrozyten oder Neuronen entwickeln (Waldeyer „Anatomie des Menschen“, 2003). Unter physiologischen Bedingungen sind Astrozyten an der Aufrechterhaltung der Homeostase im ZNS beteiligt. Sie sind für den Metabolismus ausgeschütteter Neurotransmitter sowie die Regulation des extrazellulären pH-Wertes und der Kalium-Ionen Konzentration verantwortlich (Dong und Benveniste, 2001). Neben diesen Funktionen bilden zytosolische Ausläufer von Astrozyten die *Glia Limitans*. Die Ausläufer lagern sich um alle das ZNS durchziehenden Blutgefäße und sind dadurch an der strukturellen und funktionellen Integrität der Bluthirnschranke (BBB) beteiligt (Dong und Benveniste, 2001).

Astrozyten besitzen unter entzündlichen Bedingungen und nach mechanischer ZNS Schädigung die Fähigkeit zur Phagozytose (Lee et al., 1990; Bechmann und Nitsch, 1997). Unter pathologischen Bedingung oder nach Stimulation durch IFN- $\gamma$  exprimieren Astrozyten das für die Antigenpräsentation notwendige MHC-II Molekül jedoch in weit geringerer Menge als Mikroglia (Wong et al., 1984; Vass und Lassmann, 1990). In wie weit Astrozyten in der Lage sind, Antigene zu präsentieren und welche kostimulatorischen Moleküle sie exprimieren, ist bis heute aufgrund teilweise entgegengesetzter Ergebnisse noch nicht geklärt (Dong und Benveniste, 2001). Anhand einer Studie konnte gezeigt werden, dass Astrozyten konstitutiv das kostimulatorische Molekül B7-2 exprimieren und nach IFN- $\gamma$  Stimulation sowohl die Expression von B7-1 und B7-2 anstieg (Soos et al., 1999). In einer anderen Studie, die ebenfalls an Astrozyten aus Mäusen durchgeführt wurde, induzierte IFN- $\gamma$  die Expression von MHC-II, jedoch nicht die Expression von kostimulatorischen Molekülen wie B7-1 oder B7-2 (Aloisi et al., 1998).

### **1.3 Die Multiple Sklerose und ihr Tiermodell, die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis**

Das Phänomen der Autoimmunität wurde erstmals 1899 von Paul Ehrlich als „horror autotoxicus“ beschrieben (Himmelweit, 1956–1960). Bei Autoimmunerkrankungen erkennt das adaptive Immunsystem einen körpereigenen Bestandteil als körperfremd und initiiert eine gegen den eigenen Organismus gerichtete Immunantwort. Die Multiple Sklerose (MS) stellt nach vorherrschender Meinung eine solche gegen ZNS-Bestandteile gerichtete Autoimmunerkrankung dar. Im Verlauf der MS entstehen bevorzugt in der weißen Substanz des ZNS fokale Entzündungen. Das Auftreten solcher Entzündungen kann im Tiermodell der MS, der experimentellen autoimmunen Enzephalomyelitis (EAE) in Mäusen, Ratten oder Affen, nachgestellt werden (siehe Kapitel 1.3.2). Um eine EAE in Tieren auszulösen, werden den Tieren körpereigene Antigene, wie Oligopeptide deren Aminosäure-

sequenz identisch sind mit der in der Myelinscheide vorkommenden Proteinen, oder Hirnhomogenate gemeinsam mit Adjuvantien injiziert.

### 1.3.1 Die Multiple Sklerose

In Europa stellt die Multiple Sklerose die häufigste neuroimmunologische Erkrankung des zentralen Nervensystems dar (30-70 Erkrankungen je 100.000 Einwohner; Kurtzke, 1995). Im Verlauf der Erkrankung kommt es bei ungefähr 85 Prozent der Patienten zur schubweisen Entstehung neuer Demyelinisierungsherde und dem Auftreten klinischer Symptomaten, wie spastischen Paresen, Gang- und Extremitätenataxien, zentraler Visusminderung und Blasenstörungen. Das Auftreten einzelner klinischer Symptome und der Krankheitsverlauf in Bezug auf die Schwere der Behinderungen weisen deutliche Unterschiede zwischen einzelnen Patienten auf. So kann der Krankheitsverlauf in 4 generelle Typen eingeteilt werden; schubförmig remittierend, sekundär progredient, chronisch progredient und schubförmig progredient (Lublin und Reingold, 1996). Auf diese akuten Schübe folgen Remissionsphasen, in denen die Entzündung innerhalb des ZNS zurückgeht und eine Abschwächung der klinischen Symptomatik zu beobachten ist. Wegen des heterogenen Krankheitsbildes der MS ist bis heute noch nicht geklärt, welche Umstände zu dieser Autoimmunerkrankung führen. Für genetische Prädisposition sprechen Untersuchungen, in denen Träger einiger spezieller HLA-DR2 Haplotypen ein verstärktes Risiko aufwiesen, an MS zu erkranken (Olerup und Hillert, 1991; Spurkland et al., 1991), als auch eine große Zwillingsstudie (Ebers et al., 1986). Ähnliches konnte für bestimmte T-Zell-Rezeptor-Gene gezeigt werden (Epplen et al., 1997). Neben der genetischen Prädisposition werden auch Virusinfektionen wie Masern, Epstein-Barr-Virus, das humane Herpesvirus-6 oder eine bakterielle Infektion mit *Chlamydia pneumoniae* (Soldan et al., 1997; Willer und Ebers, 2000) als auslösende Faktoren der MS diskutiert. Die bloße Existenz autoreaktiver T-Zellen als auslösender Mechanismus kann jedoch ausgeschlossen werden, da im Blut gesunder Probanden ebenfalls myelinreaktive T-Zellen nachgewiesen werden können (Martin et al., 1990; Trotter et al., 1998). Eine weitere Ursache können auch ethnische Faktoren darstellen; so konnte der Zusammenhang zwischen Krankheitsrisiko und Ortsgebundenheit nachgewiesen werden (Dean und Kurtzke, 1971; Kurtzke, 1995).

Während der MS kommt es zur fokalen Infiltration von autoreaktiven T-Zellen ins ZNS. Es wird davon ausgegangen, dass diese T-Zellen eine gegen die Myelinscheidenproteine gerichtete Entzündung initiieren (siehe Abbildung 3). Diese Theorie wird gestützt von der Beobachtung, dass es vor dem Ausbruch eines Krankheitsschubes zur klonalen Expansion myelinreaktiver T-Zellen in der Peripherie kommt (Muraro et al., 2002). Im Verlauf der Entzündung werden Myelinbestandteile von Mikroglia/Makrophagen phagozytiert und es kommt zum Absterben von Neuronen und Oligodendrozyten (Brück et al., 2002). In histologischen Schnittpräparaten können die Entzündungsherde als entmarkte Areale (*Plaques*) sichtbar gemacht werden. Die Erkennung der Läsionen erfolgt diagnostisch nicht-invasiv mittels Computertomographie oder Magnetresonanztomographie.

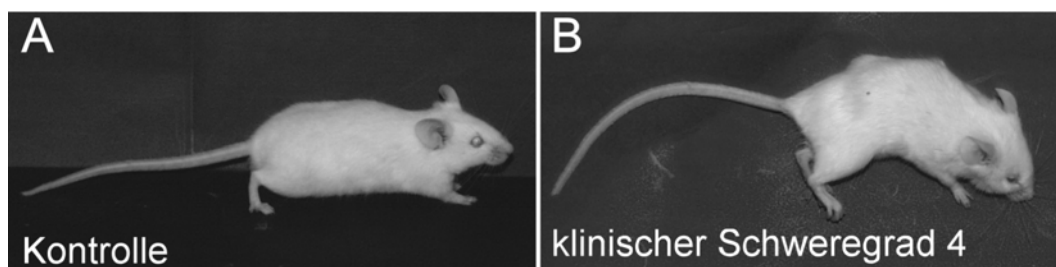
Anhand von Tiermodellen konnten unterschiedliche Therapiestrategien entwickelt werden, die heute in der Klinik Anwendung finden. Zu ihnen gehören die Behandlungen mit Cortikoiden, Interferon- $\beta$  (IFN- $\beta$ ) und Copolymer 1 (Jacobs et al., 1995; Johnson et al., 1995; Pette et al., 1997; Pozzilli et al., 2004). Nicht bei allen Patienten tritt bei der Behandlung eine Verbesserung der Krankheitssymptome auf (Pender und Wolfe, 2002). Da bis heute keine kausale Therapie existiert ist ein besseres Verständnis der Mechanismen, die zentralnervöse Autoimmunität

auslösen und der immunregulatorischen Mechanismen, die während des Krankheitsverlaufes einen Schub beenden, wichtig für die Entwicklung effektiverer Behandlungen.

### 1.3.2 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

Die Grundlage zur Entdeckung einer durch Immunisierung ausgelösten EAE beruht auf einem von Luis Pasteur durchgeführten Experiment. In diesem Versuch wurden Kaninchen mit aus Kaninchengehirnen aufgereinigten inaktivierten Tollwutviren geimpft. Die Tiere entwickelten eine tödlich verlaufende ZNS Entzündung. In späteren Experimenten konnte gezeigt werden, dass diese Entzündung im ZNS durch Verunreinigungen der Virenpartikel mit Hirngewebsrückständen verursacht wurde (Rivers et al., 1933). Als die Entzündung auslösende Faktoren konnten Myelinbestandteile wie das basische Myelinprotein (MBP), Myelin Oligodendrozyten Glycoprotein (MOG) und das Proteolipidprotein (PLP) identifiziert werden (Laatsch et al., 1962; Zamvil und Steinmann, 1990; Linington et al., 1993). Die grundlegenden Mechanismen der EAE Induktion nach Freund (Freund et al., 1947), also die Verwendung von Adjuvantien und Selbstantigenen in einer Öl-Wasser-Emulsion, sind in den einzelnen Modellen vergleichbar. Jedoch weisen unterschiedliche Mausstämme Resistenz gegen einige Myelinbestandteile auf, die in anderen Stämmen für die Induktion der EAE verwendet werden können (Weckerle et al., 1994).

Klinisch wird die EAE, je nach verwendetem Tiermodell, etwa 5-10 Tage nach erfolgter Immunisierung im Form aufsteigender Bewegungsstörungen, Lähmungen des Schwanzes und der Extremitäten deutlich (Abbildung 2).



**Abbildung 2: Klinische Auswirkung der EAE**

Dargestellt ist eine gesunde Maus (A) und eine auf der Seite liegende, an EAE erkrankte Maus (B), mit einem klinischen Schweregrad 4. Im Vergleich zu dem gesunden Kontrolltier werden die Lähmungserscheinungen des Schwanzes und der Hinterbeine der erkrankten Maus deutlich. Ebenfalls wird die für die Erkrankung typische Verkrümmung des Rückens sichtbar.

Neben der Immunisierung mit ZNS-Homogenat oder synthetischen Oligopeptiden die als aktive EAE bezeichnet wird, ist die Krankheitsinduktion auch durch adoptiven Transfer autoreaktiver T-Zellen (passive EAE) möglich (Bernard et al., 1976; Tuohy et al., 1989, van der Veen et al., 1989; Weckerle et al., 1994, Petry et al., 2000; Gold et al., 2000).

Für die aktive EAE werden heute meist synthetisch hergestellte Oligopeptide verwendet, da diese eine spezifischere Immunantwort auslösen als Hirnhomogenate oder aufgereinigtes Myelin. Werden Tiere mit Oligopeptiden

immunisiert, entstehen autoreaktiven T-Zellen, deren T-Zellrezeptor gegen die verwendete Aminosäuresequenz spezifisch ist, was anschließende Untersuchungen wie Antigen-spezifische Proliferationsassays ermöglicht. Ebenfalls können in den Modellen der aktiven EAE die Mechanismen, die zur Entstehung von Autoimmunität führen untersucht werden. Mittels der passiven Immunisierung über den Zelltransfer aktivierter autoreaktiver T-Zellen können spezifische Zelllinien verwendet werden (Pettinelli et al., 1981). Handelt es sich dabei um markierte T-Zellen, so können Prozesse wie in vivo Proliferation und organspezifische Einwanderung („homing“) untersucht werden (Flügel et al., 2001A +B). Durch die Verwendung gentechnisch veränderter T-Zellen ist es möglich, die Wirkung spezifischer Moleküle zu untersuchen. So können T-Zellen, denen ein bestimmtes Gen fehlt oder defekt ist, bzw. die ein spezielles Protein überexprimieren, in Wildtyp Mäuse injiziert werden. Auf diese Weise konnte etwa die Beteiligung des Todesliganden CD95L an der Schädigung und Immunmodulation in der EAE belegt werden (Sabelko-Downes et al., 1999).

In dieser Arbeit wurde die aktive Immunisierung von SJL Mäusen mit dem Oligopeptid PLP<sub>139-151</sub> verwendet, da damit der schubförmige Krankheitsverlauf der MS nachgestellt werden kann. Aufgrund des Krankheitsverlaufes dieses Modells konnte insbesondere die spontane Erholung (Remission) untersucht werden, was in anderen Modellen wie der C57BL/6J Maus aufgrund eines monophasischen Krankheitsverlaufes nicht möglich gewesen wäre. PLP<sub>139-151</sub> besteht aus den Aminosäuren 139-151 des Myelinbestandteils Proteolippoprotein. Das verwendete Modell zeichnet sich durch zwei Krankheitsschübe aus, wobei der erste klinisch über einen Zeitraum von 4-5 Tagen ging und der zweite chronisch progredient ab dem 20. Tag auftrat (Tabelle 1). Aufgrund dieser Verlaufsform können nicht nur akute und chronische Inflammation untersucht werden, sondern auch die dazwischen liegende Erholungsphase.

**Tabelle 1: klinische Phasen der aktiven SJL-EAE**

Tage nach Immunisierung	Phase	Klinische Symptome
0-10	vorklinische Phase	Keine
11-15	akute Phase	Ataxien und Lähmungen
15-19	Remissionsphase	Erholung teilweise völlige Genesung
20-	Relapsephase	chronisch fortschreitende motorische Störungen

Das verwendete Immunisat enthält neben PLP<sub>139-151</sub> noch abgetötete *Mycobakterien Tuberculosis*, welche ein starkes Adjuvanz darstellen und eine Th1 Antwort gegen das beigefügte Oligopeptid PLP<sub>139-151</sub> auslösen. Die Wirkung des injizierten Pertussistoxin auf die EAE Induktion ist nicht eindeutig geklärt. Pertussistoxin ist eine ADP-Ribosyltransferase mit hemmendem Effekt auf G-Proteine. Es verstärkt die Proliferation von T-Zellen (Gray et al., 1989). Des weiteren wird angenommen, dass Pertussistoxin die Blut-Hirnschranke öffnet und so die Migration von aktivierten T-Zellen in das ZNS fördert (Linthicum et al., 1982; Brabb et al., 1997).

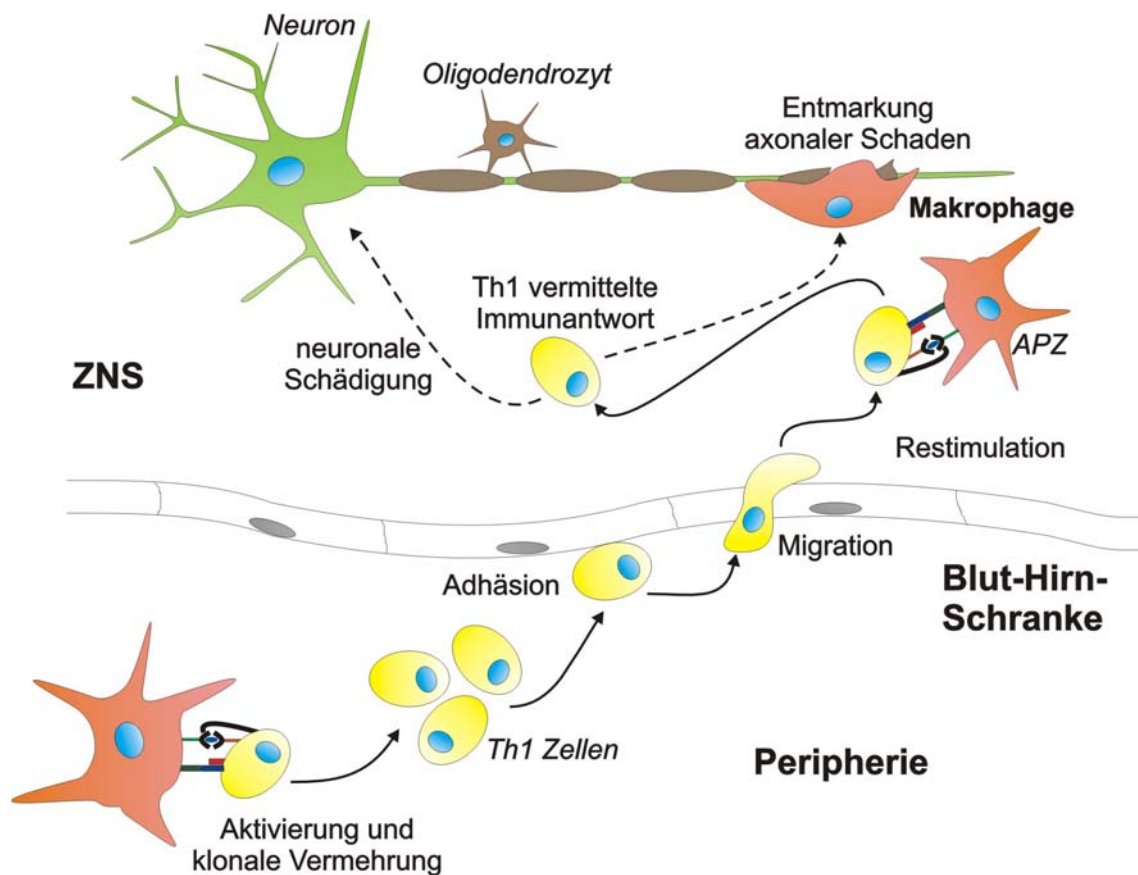
Diese wandern durch die Endothelien kleiner Gefäße in die perivaskulären Räume des ZNS und im weiteren Verlauf der Erkrankung über die *Glia Limitans* in das ZNS Parenchym. Die an dieser Migration beteiligten Mo-

leküle stellen auf Seite der Endothelien insbesondere P-Selektin und Integrin-Liganden dar. Für den Zell-Zellkontakt und die Migration der T-Zellen ist die Expression von P-Selektin Glykoprotein Ligand 1 (PSGL1) und Zelladhäsionsmoleküle (CAM) wie induzierbares CAM (ICAM1) und vaskulärem CAM (VCAM1) oder das Leukozyten Funktions-assoziierte Antigen 1 (LFA1) notwendig (Piccio et al., 2002; Kerfoot und Kubes, 2002). Die genaue Beteiligung der einzelnen Moleküle konnte bis heute noch nicht eindeutig geklärt werden, da in ähnlichen Studien unterschiedliche Ergebnisse gewonnen wurden. So verhinderte die Blockade der  $\beta 2$ -Untereinheit von LFA1 die Induktion einer passiven EAE (Gordon et al., 1995). In anderen Arbeiten hatte die Blockade von LFA1 jedoch keinen Effekt auf die Induktion der aktiven oder auch passiven EAE (Welsh et al., 1993; Canella et al., 1993). Da die Interaktion zwischen ICAM1 und LFA1 oder VCAM1 und VLA4 (Integrin- $\alpha 4$ ) nicht nur für die Migration, sondern auch für die Kostimulation und Interaktion zwischen Antigen-präsentierender Zelle und T-Zelle wichtig sind, ist es nicht möglich, Daten, die mit *knock-out* Mäusen gewonnen wurden, ausschließlich auf die Migrationsfähigkeit der aktivierten T-Zellen zu beziehen (Ransohoff et al., 2003).

Man geht davon aus, dass aktivierte Th1-Zellen nach dem Überwinden der Blut-Hirn-Schranke durch die Sekretion proinflammatorischer Zytokine und Chemokine die Entzündung initiieren (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991). T-Helferzellen differenzieren nach primärem Antigenkontakt im peripheren lymphatischen System in die Typen 1 und 2. Während Th2-Zellen hauptsächlich für die humorale Immunantwort verantwortlich sind stellen Th1-Zellen die Hauptmediatoren der spezifischen zellulären Abwehr dar (Mosmann und Coffmann, 1989). Durch die Immunisierung mit PLP-Peptid entstehen in der Peripherie, gegen das injizierte Autoantigen spezifische, folglich autoreaktive Th1-Zellen (Tuhoy 1989). Solche Zellen können organspezifische Autoimmunerkrankungen wie die EAE auslösen.

Zwei der von Th1-Zellen produzierten Zytokine sind  $\text{IFN-}\gamma$  und  $\text{TNF-}\alpha$ , welche die Durchlässigkeit der Blut-Hirn-Schranke durch Aktivierung der Endothelzellen beeinflussen (Minagar und Alexander, 2003). Eine verstärkte Rekrutierung von Monozyten/Makrophagen aus der Peripherie erfolgt durch die Synthese des Chemokins MIP-1 $\alpha$  (CCL3) in Astrozyten (Ransohoff et al., 1993; Glabinski et al., 1997). In den Entzündungsherden können neben T-Zellen und Makrophagen auch eingewanderte dendritische Zellen, natürliche Killerzellen und B-Zellen nachgewiesen werden (Serafini et al., 2000; Chavaria und Alcocer-Varela, 2004).

Während der EAE kommt es neben der Phagozytose der Myelinschicht durch eingewanderte Makrophagen und aktivierte Mikroglia auch zum Zelltod von Motoneuronen und Oligodendrozyten (Smith und de Long, 1987; Benveniste 1997; Hishara et al., 2003). Der Verlust von Neuronen in der EAE wird für die klinischen Ausfallerscheinungen verantwortlich gemacht (Wujek et al., 2002). Neben oxidativer Schädigung der Neurone durch Sauerstoffradikale während der Entzündung wird auch die neurotoxische Wirkung von phagozytierten Myelinabbauprodukten diskutiert (Diestel et al., 2003). Die Induktion der EAE durch autoreaktive Th1 Zellen ist schematisch in Abbildung 3 dargestellt.



**Abbildung 3: Modell der Entzündungsentstehung der aktiven EAE**

Durch Injektion des Immunisates wird PLP<sub>139-151</sub> in den lymphatischen Organen von antigenpräsentierenden Zellen naiven T-Zellen präsentiert. Als Folge kommt es zur klonalen Vermehrung PLP reaktiver Th1 Zellen. Diese Th1 Zellen wandern über die Blut-Hirn-Schranke in das ZNS ein. Durch Antigenpräsentation von ZNS residenten antigenpräsentierenden Zellen erfolgt die Reaktivierung der Th1 Zellen, die nun voll aktiviert proinflammatorische Zytokine ausschütten und die Entzündung initiieren. Im Verlauf der Entzündung kommt es zur Schädigung von Neuronen und Phagozytose von Myelin durch Mikroglia und eingewanderte Monozyten.

In der Remissionsphase stellt die Eliminierung autoreaktiver T-Zellen aus der Peripherie und dem ZNS einen grundlegenden Mechanismus der Entzündungsregulation in der EAE dar (Schmied et al., 1993; Zeine und Owens, 1993; Tabi et al., 1995). Die Elimination von T-Zellen über CD95L konnte durch adoptiven Transfer mit myelinspezifischen T-Zellen in CD95L defiziente Mäuse (gld) im EAE-Modell belegt werden (Sabelko-Downes et al., 1999). Ebenfalls wird die klinische Erholung von einer Änderung der Zytokinexpression, wie der Reduktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  als auch der gesteigerten Expression von Interleukin-10 (IL-10) begleitet (Kennedy et al., 1992; Begolka et al., 1998). Die proinflammatorischen Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  konnten im ZNS sowohl in der MS, als auch in der EAE in den Läsionen in erhöhter Konzentration nachgewiesen werden (Brosnan et al., 1995; Cannella und Raine, 1995). Sowohl IFN- $\gamma$ <sup>-/-</sup> knock-out Mäuse als auch TNF- $\alpha$ <sup>-/-</sup> knock-out Mäuse zeigen stärkere Ausfallerscheinungen während der EAE und eine schwächere Erholung nach dem klinischen Schub (Ferber et al., 1996; Frei et al., 1997). Anhand dieser Arbeiten konnte gezeigt werden, dass zwei eigentlich als proinflammatorisch definierte Zytokine auch immunregulatorische Mechanismen auslösen können. **Ein durch IFN- $\gamma$  induzierbares immunregulatorisches Enzym stellt die Indolamin 2,3- Dioxygenase (IDO) dar** (siehe



Kapitel 1.4). Die immunsuppressive Wirkung konnte in vivo bereits für die Plazenta (Munn et al., 1998), die Lunge (Hayashi et al., 2004) und in Transplantationsexperimenten (Gorczynski et al., 2002) belegt werden.

### 1.3.3 Mikroglia in der MS und EAE

Die Mikroglia reagiert als erster ZNS spezifischer Zelltyp auf pathologische Veränderungen im ZNS. Da die Elimination peripherer Monozyten den Krankheitsverlauf der EAE abschwächen oder verhindern kann (Huitinga et al., 1990; Bauer et al. 1995), ist es naheliegend, dass die Mikroglia erst durch aus der Peripherie eingewanderte Zellen aktiviert wird. In den Entzündungsherden des ZNS während EAE oder MS exprimiert die aktivierte Mikroglia zahlreiche proinflammatorische Botenstoffe wie IL-1, IL-6, TNF- $\alpha$ . IL-1 und IL-6 sind an der ZNS Entzündung in der EAE maßgeblich beteiligt: So erwiesen sich IL-6<sup>-/-</sup> Mäuse als resistent gegen die Induktion einer EAE. Nach erfolgter Immunisierung dieser transgenen Mäuse konnte keine klonale Expansion autoreaktiver T-Zellen im Lymphsystem nachgewiesen werden (Samoilova et al., 1998). TNF- $\alpha$  wird ebenfalls als Initiator der autoimmunen ZNS Entzündung angesehen (Taupin et al., 1997). So induziert TNF- $\alpha$  in vitro Apoptose in Oligodendrozyten (Selmaj et al. 1991). Während der Erkrankung exprimieren aktivierte Mikroglia MHC-II und kostimulatorische Moleküle wie B7.1 (Juedes und Ruddle, 2001). Die aktivierte Mikroglia ist sowohl an der Phagozytose von Myelinbestandteilen als auch an der Phagozytose inflammatorischer T-Zellen beteiligt (Chan et al., 2001). Neben diesen die autoimmune Entzündung fördernden Eigenschaften der Mikroglia exprimiert dieser Zelltyp die induzierbare Nitritoxyd-Synthetase (iNOS), was zu der verstärkten Freisetzung von NO führt (Tran et al., 1997). NO kann mit Superoxid-Anion zu Peroxynitrit (ONOO<sup>-</sup>) reagieren, welches durch die Oxidation von Proteinen empfindlicher Zellen, wie Neuronen, zum Zelltod führen kann (Calabrese et al., 2000). Die Rolle von NO in Bezug auf die EAE ist nicht sicher geklärt, da neben neurotoxischen Effekten auch davon ausgegangen wird, dass die verstärkte NO Synthese ebenfalls an der Eliminierung inflammatorischer Zellen im ZNS beteiligt ist (Okuda et al., 1997). Während der EAE exprimieren Mikroglia den Todesliganden CD95-L und induzieren in infiltrierenden T-Zellen Apoptose (Bonetti et al., 1997). Diese Beobachtungen belegen, dass die Mikroglia in der EAE sowohl protektive als auch destruktive Eigenschaften besitzt. Aufgrund des komplexen Gefüges aus Zellbotenstoffen und teilweise gegensätzlicher Funktionen exprimierter Enzyme ist die Rolle der Mikroglia als Verstärker oder Eindämmer der Schädigung offenbar abhängig von dem Gleichgewicht pro- und anti-inflammatorischer Signale.

### 1.3.4 Astrozyten in der MS und EAE

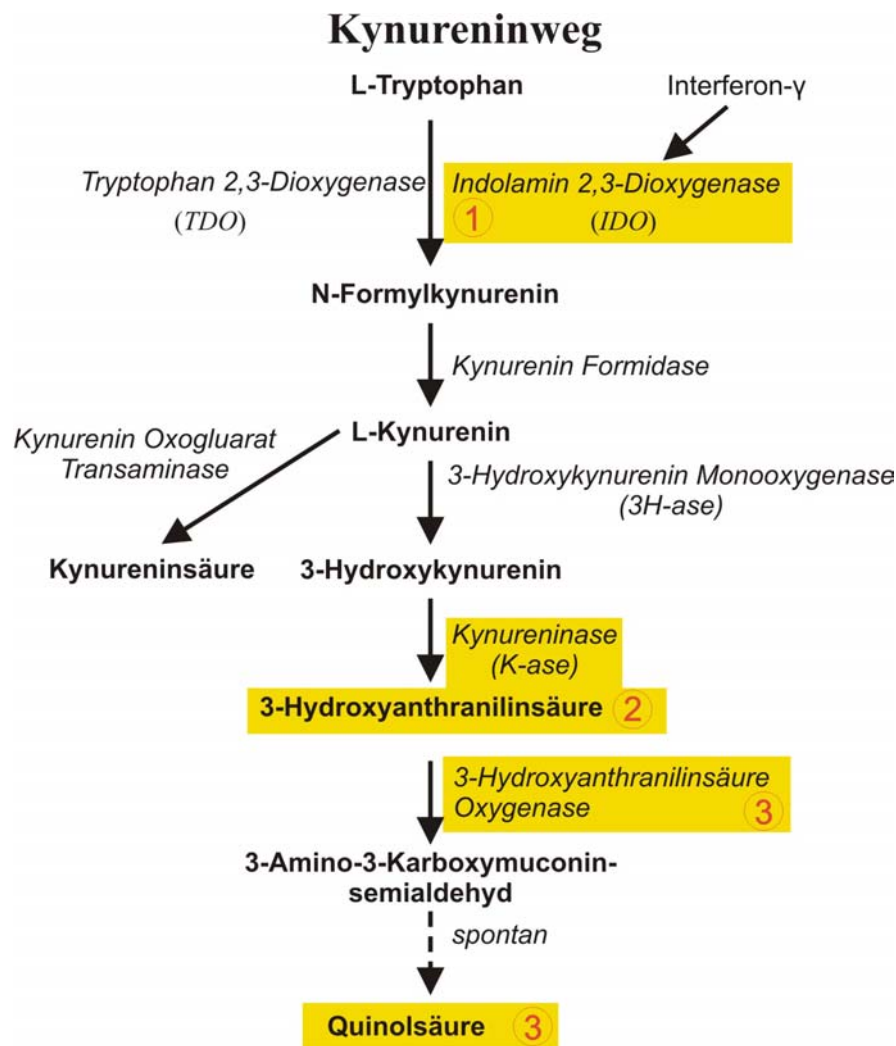
In akuten EAE Läsionen werden Astrozyten aktiviert. Sie steigern die Synthese des astrozytenspezifischen sauren gliafibrillären Proteins (GFAP), das auch noch Monate nach erfolgter Immunisierung in hoher Konzentration vorliegt (Smith et al., 1983; Smith und Eng, 1987). Die Funktion dieses als Astroglieose bezeichneten Phänomens ist bis heute nicht geklärt, jedoch konnte gezeigt werden, dass in GFAP<sup>-/-</sup> *knock-out* Mäusen der Verlauf der EAE deutlich stärker war, als in Kontrolltieren (Liedtke et al., 1998). Ebenfalls zeigten immunisierte Metallothionin-I+II<sup>-/-</sup> *knock-out* Mäuse einen stärkeren Krankheitsverlauf. Im Rückenmark dieser Tiere konnte eine verringerte Astroglieose nachgewiesen werden (Penkowa et al., 2001). Die Astroglieose wird als relativ unspezifischer Aktivierungsmarker für Astrozyten aufgefasst.

Einen möglichen Mechanismus für die Immunsuppressive Wirkung der Astrozyten in der EAE könnte die Apoptoseinduktion infiltrierender T-Zellen darstellen. In EAE Rückenmarksinfiltraten können apoptotische T-Zellen im Kontakt mit CD95-L und GFAP doppelt positiven Astrozyten beobachtet werden (Kohji und Matsumoto, 2000). Die Beteiligung des CD95-Systems an der Entzündungsregulation wurde bereits ein Jahr zuvor beschrieben (Sabelko-Downes et al., 1999). Des Weiteren sind Astrozyten in der Lage, zahlreiche neurotrophe und neuroprotektive Substanzen, wie NGF („Nerve growth Faktor“), TGF- $\beta$ , aber auch potenziell neurotoxische Enzyme wie iNOS zu exprimieren (Ridet et al., 1997).

Während in der Vergangenheit Astrozyten hauptsächlich eine neuroprotektive Funktion zugeschrieben wurde, wird heute immer stärker die Frage diskutiert, ob Astrozyten nicht auch verstärkend auf die autoimmune Entzündung im ZNS während EAE und MS wirken (De Keyser et al., 2003). Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse zur Fähigkeit von Astrozyten zur vollständigen Antigenpräsentation und Kostimulation kann hierzu bisher noch keine abschließende Aussage getroffen werden (siehe Kapitel 1.2).

## **1.4 Induzierter Tryptophandegradation als immunregulatorischer Mechanismus**

Essentielle Aminosäuren können definitionsgemäß vom Körper nicht selbstständig synthetisiert werden. Um Mangelercheinungen zu verhindern, müssen diese daher über die Nahrung aufgenommen werden. Biochemisch stellt Tryptophan die energiereichste Aminosäure dar. Über die Nahrung aufgenommenes Tryptophan wird über die Leber ins Serum des Blutes abgegeben und dient den Zellen des gesamten Organismus als Baustein für die Proteinbiosynthese (Moffett und Namboodiri, 2003). Im ZNS wird aus Tryptophan der Neurotransmitter Serotonin, und in der Zirbeldrüse das für den Tag-Nacht-Rhythmus wichtige Hormon Melatonin synthetisiert (Branchey et al., 1982). Der größte Teil des aufgenommenen Tryptophans (ca. 70%) wird über den Kynureninweg in der Leber (Abbildung 4) abgebaut. Im ersten Schritt des Kynureninweges wird L-Tryptophan durch Dioxygenasen zu N-Formylkynurenin oxidiert. Es existieren zwei Isoenzyme, die diese Reaktion katalysieren. In der Leber ist es die von Leberzellen (Hepatozyten) exprimierte Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO), die für die Serumkonzentrationen der Aminosäure im Blut verantwortlich ist (Saito et al., 1991). Neben diesem Enzym konnte 1963 ein weiteres Enzym, die induzierbare Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), beschrieben werden (Higuchi et al., 1963). IDO gehört zu den Hämeenzymen und vermittelt die oxidative Spaltung des Pyrrolringes von Tryptophan (Daley-Yates et al., 1988). IDO stellt außerhalb der Leber das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Kynureninweges dar (Moffett und Namboodiri, 2003). Während der Degradation von Tryptophan über den Kynureninweg entstehen zahlreiche Intermediate mit unterschiedlichen Wirkungen und Funktionen (Kapitel 1.5.2-4). Die Tryptophanmetabolite und die beteiligten Enzyme des Kynureninweges sind in Abbildung 4 dargestellt. IDO kann durch IFN- $\gamma$  in Fibroblasten, Monozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen induziert werden, wobei eine zusätzliche Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder LPS die Enzymexpression synergistisch steigert (Carlin et al., 1989; Currier et al., 2000; Robinson et al., 2003; Fallarino et al., 2002A). Auch humane Mikroglia können in vitro Tryptophan zu Quinolsäure verstoffwechseln, was das Vorhandensein aller am Kynureninweg beteiligten Enzyme, also auch von IDO, voraussetzt (Heyes et al., 1996). In Zellkultur führt die Induktion von IDO zu einem verstärkten Abbau von Tryptophan (Munn et al., 1999).



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des Kynurenin Weges**

In der Leber wird ein Teil des Tryptophan durch die Tryptophan 2,3-Dioxygenase (TDO) zu N-Formylkynurenin abgebaut. Außerhalb der Leber kann diese Reaktion durch IFN- $\gamma$  induzierte Expression der IDO stattfinden.

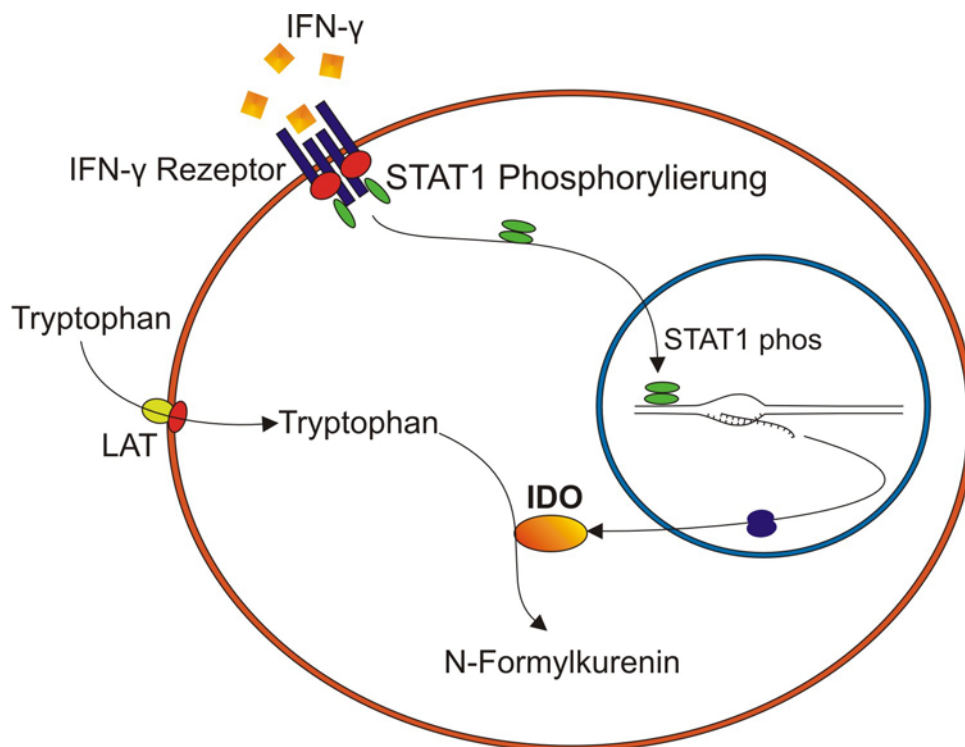
In der Peripherie spaltet IDO (1) als erstes Enzym des Kynurenin Weges oxidativ den Pyrrolring des Tryptophans, was zur Bildung von N-Formylkynurenin führt. Über die Hydrolyse des N-Formylkynurenin durch die Kynurenin Formamidase entsteht L-Kynurenin, welches durch die Oxidierung durch Kynurenin 3-Monooxygenase zu 3-Hydroxykynurenin wird. Die Kynureninase vermittelte Hydrolyse von 3-Hydroxykynurenin bildet 3-Hydroxyanthranilin Säure, welche durch 3-Hydroxyanthranilin Säure Oxygenase zu 3-Amino-3-Karboxymucon Semialdehyd oxidiert wird. Dieses instabile Intermediat reagiert spontan zu dem Neurotoxin Quinolsäure.

Immunologisch wichtige Zwischenschritte:

Die lokale Expression von IDO führt sowohl intra- als auch extrazellulär zu einer Tryptophan Verarmung, was zu einer verminderten Proliferation von Krankheitserregern aber auch von aktivierten T-Helferzellen führt (1). In Zellkultur werden aktivierte Th1 Zellen unter Tryptophan Mangel sensibler gegenüber CD-95L induzierte Apoptose. 3-Hydroxyanthranilin Säure (2) und Quinolsäure (3) induzieren in einigen Leukozyten-Populationen, vornehmlich Th1 Zellen eine CD-95L unabhängige Apoptose, beide Substanzen können jedoch auch bei längerer Exposition neurotoxisch wirken.

### 1.4.1 Induktion der IDO durch IFN- $\gamma$

Die Expression von IDO in Makrophagen und Fibroblasten ist abhängig von der Aktivierung des IFN- $\gamma$  Rezeptors (Abbildung 5; Du et al., 2000; Sotero-Esteva et al., 2000). An den IFN- $\gamma$  Rezeptor sind intrazellulär zwei Moleküle des Transkriptionsfaktors STAT1 gebunden. Die Bindung von IFN- $\gamma$  an den Rezeptor bewirkt intrazellulär die Aktivierung von Janus Kinase 1 und 2 (Jak 1, Jak 2), die wiederum STAT1 durch Phosphorylierung aktivieren. Zwei phosphorylierte STAT1 Moleküle bilden ein Dimer, das im Zellkern an spezifische DNA Sequenzen, wie zum Beispiel an die IFN- $\gamma$  aktivierte Sequenzregion (GAS) des IDO Promoters (Du et al., 2000) bindet. Dadurch wird die Transkription des IDO Gens mit anschließender Translation zum Protein ausgelöst. Das reife funktionelle Enzym im Zytosol führt zum intrazellulären Abbau von Tryptophan. Aus dem extrazellulären Raum wird über 'large amino acid transporter' (LAT) weiteres Tryptophan in die Zelle transportiert (Verrey et al., 1999), was zu einer Verarmung der Extrazellulärräume an Tryptophan führen kann (Munn et al., 1998).



**Abbildung 5: Schematische Darstellung der IFN- $\gamma$  induzierten Expression von IDO**

Die Bindung von IFN- $\gamma$  an den Rezeptor bewirkt die Aktivierung von Jak 1 und Jak 2, die das am Rezeptor gebundene STAT1 phosphorylieren. Zwei phosphorylierte STAT1 bilden ein Homodimer und binden an die GAS Region des IDO Promotors, was die Transkription des Gens ermöglicht. Nach ribosomaler Translation der IDO mRNA liegt das Enzym aktiv im Zytosol der Zelle vor, wo es den Abbau von Tryptophan zu N-Formylkurenin katalysiert.

### 1.4.2 IDO während bakterieller Infektionen

In zahlreichen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass in Zellkultur die Proliferation von intrazellulären Krankheitserregern wie *Chlamydia trachomatis*, *Toxoplasma gondii* und *Staphylokokkus aureus* durch IFN- $\gamma$  induzierte IDO Expression in Fibroblasten und Makrophagen unterdrückt werden konnte (Pfefferkorn et al., 1984; Beatty et

al., 1994; Nagineni et al., 1996; Nettelbrecher et al., 1998; Daubener et al., 1999; Schroten et al., 2001). Die Blockierung der IDO Aktivität durch den spezifischen Inhibitor 1-Methyl-Tryptophan verhinderte diesen Effekt der IFN- $\gamma$  Stimulation. IDO bewirkt also die Reduktion der Vermehrung und Verbreitung von Krankheitserregern. Dieser antiparasitäre Effekt wurde zumeist auf die lokale Verarmung an Tryptophan zurückgeführt (Pfeferkorn et al., 1984). Diese Hypothese wird bis heute kontrovers diskutiert, da einige Bakterien wie der intrazelluläre Parasit *Chlamydophila psittaci* in der Lage sind, Kynurenin zu Tryptophan zu katabolisieren (Xie et al., 2002). Als Schutzmechanismus reagieren sowohl Säugerzellen (Fleckner et al., 1995; Barcelo-Battlori et al., 2002) als auch einige Bakterien auf geringe Tryptophan Konzentration mit der verstärkten Synthese von Tryptophanyl-tRNA (tRNA<sup>trp</sup>), wodurch die Proteinbiosynthese der Zellen gewährleistet bleibt (Sarsero et al., 2000). Die Expression von IDO würde in einem solchen Fall dem Wirt keinen Vorteil gegenüber dem Erreger verschaffen. Ebenfalls konnte in einer in vivo Studie gezeigt werden, dass aufgrund einer Malaria Infektion in Mäusen zwar IDO aktiviert wurde und es zu einer lokalen Tryptophan Verarmung kam, die Parasiten jedoch nicht in Ihrer Vermehrung beeinträchtigt wurden (Sanni et al., 1998). Zur Zeit ist es weder möglich, die Tryptophanverarmungshypothese eindeutig zu be- oder zu widerlegen, da je nach verwendetem Modell die Ergebnisse stark variieren und es nicht möglich ist, lokale Tryptophan -Konzentration in vivo zu bestimmen.

### 1.4.3 IDO in der AIDS-Enzephalopathie

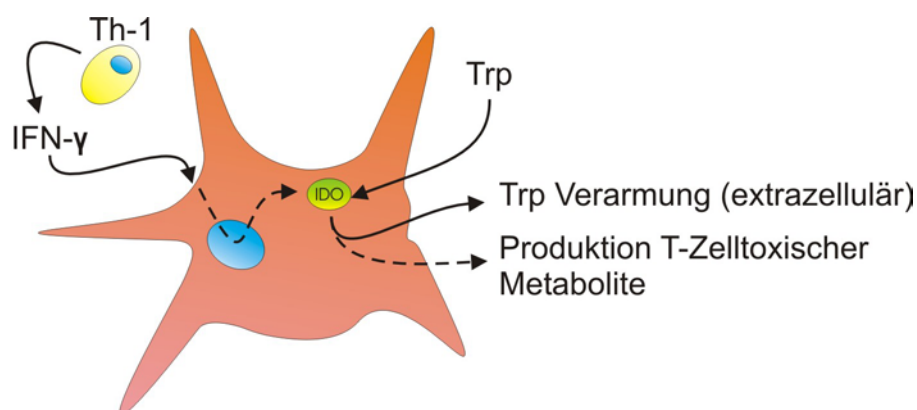
Studien mit humanen Immundefizienz Virus (HIV) positiven „aquired immuno deficeincy syndrom“ (AIDS) Patienten mit einer Enzephalopathie zeigten eine geringere Tryptophankonzentration in der Gehirnflüssigkeit (*Liquorcerebrospinales*), als nicht infizierte Patienten. Gleichzeitig konnten erhöhte Konzentrationen an Kynurenin und Quinolsäure nachgewiesen werden (Heyes et al., 1992, 1998, 2001; Sei et al., 1995). Übereinstimmend mit den klinischen Daten am Menschen konnten auch kontinuierlich hohe Konzentrationen an Quinolsäure im Gehirn von „simian immuno deficiency virus“ (SIV) infizierten Rhesusaffen gezeigt werden (Rausch et al., 1994), wobei IDO exprimierenden Zellen als Mikroglia/Makrophagen identifiziert wurden (Depboylu et al., 2004). Es wird davon ausgegangen, dass durch das Virus der Kynureninweg über lange Zeit aktiv ist. Daraus resultiert die Produktion von unphysiologisch hohen Konzentrationen von Quinolsäure, das für die neuronale Schädigung der AIDS-Enzephalopathie verantwortlich gemacht wird (Heyes et al., 2001). Quinolsäure stellt einen NMDA-Rezeptor Agonisten dar. Eine Bindung von Quinolsäure an den NMDA-Rezeptor auf Neuronen wirkt, wie NMDA selbst, exzitatorisch. Durch die hohe Konzentration von Quinolsäure werden die Neurone jedoch so stark stimuliert, dass exzitotoxische Effekte auftreten (Schwarcz und Pellicciari, 2002). 3-Hydroxykynurenine, das vor Quinolsäure im Kynureninweg gebildet wird, kann ebenfalls neurotoxisch durch die Bildung von Sauerstoff-Superoxid und Wasserstoffperoxyd wirken (Goldstein et al., 2000). Eine neuroprotektive Wirkung konnte für Kynurensäure nachgewiesen werden (Wirsching et al., 1989). Sie wird durch die Kynurenin Transaminase aus L-Kynurenin gebildet (siehe Abbildung 4).

### 1.4.4 IDO als immunregulatorisches Enzym

David Munn und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die systemische Inhibition von IDO in trächtigen Mäusen zur T-zell-vermittelten Abstoßung allogener, aber nicht syngener, Feten führt (Munn et al., 1998). Solche Abstoßungsreaktionen konnten in *knock-out* Mäusen, die keine reifen T-Zellen besitzen (RAG<sup>-/-</sup>-Mäusen), nicht beo-

bachtet werden (Munn et al., 1998). In dieser Arbeit konnte erstmalig gezeigt werden, dass das Immunprivileg (Kapitel 1.1) eines Organs durch die pharmakologische Inhibition eines Enzyms nicht mehr zum tragen kam. In einer Folgearbeit konnte die Arbeitsgruppe zeigen, dass Makrophagen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  das im Medium vorhandene Tryptophan verstoffwechseln. Als Folge wurden die in Kokultur gehaltenen T-Zellen an ihrer Proliferation gehindert (Munn et al., 1999). Die T-Zellen stagnierten trotz Antigenpräsentation und Kostimulation in der späten G<sub>1</sub>-Phase des Zellzyklus. Als Erklärung dieser Beobachtungen wurde die Tryptophanverarmungshypothese von Pfefferkorn (Pfefferkorn, 1984) aufgegriffen. Es wurde postuliert, dass die Abstoßung der Plazenta durch das Erzeugen eines an Tryptophan verarmten Mikroklimas vor der T-zell-vermittelten Abstoßung schützt. Diese Hypothese orientierte sich an den früheren Studien mit intrazellulären Parasiten, in denen ebenfalls davon ausgegangen wurde, dass der inhibitorische Effekt von IDO auf die Tryptophandegradation zurückzuführen war (siehe Kapitel 1.4.2). Ein weiterer Hinweis für die immunmodulatorische Rolle von IDO stellt die gesteigerte Sensitivität gegenüber CD95L-induzierter Apoptose von T-Zellen dar, die in Tryptophan verarmten Medium kultiviert wurden (Lee et al., 2002). Die Sensitivitätssteigerung von T-Zellen gegenüber CD95L induzierte Apoptose könnte ebenfalls einen Schutzmechanismus für das ZNS nach Trauma darstellen, da dieser Todesligand nach mechanischer Schädigung auf Astrozyten exprimiert wird (Bechmann et al., 2002).

Der immunsuppressive Charakter von IDO könnte ebenfalls auf die Synthese von Tryptophanabbauprodukten zurückzuführen sein (Abbildung 6). Die Proliferation von T-Zellen in Kokultur mit IDO exprimierenden dendritischen Zellen wird trotz ausreichend vorhandenem Tryptophan unterdrückt (Frumento et al., 2002). Diese Unterdrückung der Proliferation konnte in T-Zellkulturen durch die drei Tryptophanabbauprodukte Kynurenin, 3-Hydroxykynurenin und 3-Hydroxyanthranilin Säure (Abbildung 4) bewirkt werden (Terness et al., 2002). Nicht nur die Proliferation von T-Zellen kann durch Tryptophanmetabolite beeinträchtigt werden, einige Metabolite können auch CD95L-unabhängige Apoptose in T-Helfer Zellen induzieren (Fallarino et al., 2002B). 3-Hydroxyanthranilinsäure und Quinolsäure induzieren in vitro in aktivierten Th1 Zellen einen über Caspase-8 vermittelten Zelltod (Fallarino et al., 2002 B). Die Aktivierung von IDO scheint also einen Mechanismus darzustellen, der eine Th1 Immunantwort unterdrückt. Der apoptoseinduzierende Effekt der beschriebenen Metabolite auf T-Zellen kann durch geringe Tryptophankonzentration in Zellkultur gesteigert werden (Frumento et al., 2002; von Bubnoff et al., 2002).



**Abbildung 6: Induktion und Wirkung von IDO**

IFN- $\gamma$  induziert in einem Makrophagen die Bildung von IDO, was zu einer Tryptophan-Verarmung führt. Gleichzeitig steigt die Konzentration T-zell-toxischer Tryptophan-abbauprodukte.

Die immunregulatorische Funktion von IDO konnte in vivo in Schwangerschaft, Transplantation und in Tumorexperimenten belegt werden (Munn et al., 1998; Miki et al., 2001; Alexander et al., 2002; Uyttenhove et al., 2003; Kai et al., 2003). In einem Asthmamodell in Mäusen konnte mittels in vivo Inhibition ebenfalls nachgewiesen werden, dass IDO einen wichtigen Mechanismus für die Unterdrückung dieser allergischen Erkrankung darstellt (Hayashi et al., 2004).

## 2 Zielstellung und Projekthypothese

In diesem Projekt soll die Beteiligung induzierten Tryptophanstoffwechsels entlang des Kynureninweges an der Immunregulation entzündlicher autoimmuner ZNS Erkrankung im Tiermodell der MS untersucht werden. Th-1 Zellen werden für die Induktion der EAE verantwortlich gemacht. Die fehlende Expression des Th-1 Schlüsselzytokins IFN- $\gamma$  bewirkt jedoch eine Verschlimmerung der EAE. Daher besitzt dieses Zytokin neben seiner gut verstandenen proinflammatorischen Wirkung auch eine bislang weit weniger gut erklärbare immunregulatorische Funktion.

IDO kann zwar durch IFN- $\gamma$  induziert werden, wirkt jedoch einer Th-1 Antwort entgegen. Dieses Enzym stellt somit einen guten Kandidaten dar, der für die spontane Erholung bei MS und EAE verantwortlich sein könnte. Durch die Infiltration des ZNS Parenchyms mit autoreaktiven Th-1 Zellen wird über IFN- $\gamma$  im ZNS die Expression von IDO in residenten Mikroglia oder infiltrierenden Makrophagen induziert. Die auf die Infiltrate begrenzte IDO Aktivität induziert über die Degradation von Tryptophan immunregulatorische Mechanismen wie verstärkte CD95L Sensitivität und direkte Apoptoseinduktion der infiltrierenden T-Helferzellen. Dieser selbstregulierende Mechanismus wirkt einer chronisch fortschreitenden Entzündung des ZNS entgegen.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Doktorarbeit standen die im Folgenden aufgeführten methodischen Etablierungen und Durchführungen verschiedener in vitro und in vivo Experimente.

A: Etablierung der PLP induzierten SJL-EAE

B: Bestimmung der relativen IDO Aktivität in Gewebeproben mittels HPLC

C: Ermittlung des klinischen Effektes der IDO Inhibition in vivo während der EAE

D: Identifizierung ZNS spezifischer IDO exprimierender Zellen in vivo und in Zellkultur

E: Erklärung der ermittelten in vivo Daten durch „real time“ PCR für Proteine, die an der Regulation der IDO beteiligt sind

F: Weiterführende Untersuchungen zum Kynureninweg und beteiligter Enzyme während der EAE



### **3 Material und Methoden**

#### **3.1 Präparation und Kultivierung primärer Zellkulturen**

##### **3.1.1 Primäre Astrozyten- und Mikroglia kulturen**

Für die Herstellung der Gliaprimärkulturen wurden die Gehirne neugeborener C57BL/6J Mäuse aus der Zucht des Tierstalls der Anatomie verwendet. Die Gewinnung der Zellen erfolgte nach einer modifizierten Methode von Drejer und Mitarbeitern (1985), die im Folgenden kurz erläutert wird. Alle Schritte wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt.

Die Mäuse wurden über einer gekühlten Petrischale dekapitiert, die Schädeldecke eröffnet und das Gehirn entnommen. Die Gehirne wurden in einer Petrischale mit gekühltem „Hank’s balanced salt solution“ (HBSS, Gibco BRL) gesammelt. Das Stammhirn, das Kleinhirn und die olfaktorischen Bulben wurden abgetrennt und verworfen. Durch sorgfältige Entfernung der Hirnhäute wurde eine Verunreinigung der Kulturen durch leptomeningeale Zellen weitestgehend verhindert.

Das möglichst vollständige Dissoziieren in Einzelzellen erfolgte durch die Kombination eines enzymatischen und eines mechanischen Verfahrens: das Gewebe wurde mit 1 % Trypsin (Boehringer, Deutschland) und 0,05 % DNase (Worthington, USA) für fünf min bei Raumtemperatur inkubiert. Die DNase degradiert ausgetretene Desoxyribonukleinsäure (DNA) und verhindert somit ein Verklumpen der Zellen. Diese enzymatische Reaktion wurde durch Zugabe von serumhaltigem „Dulbecco’s modifiziertes Eagle Medium“ (DMEM, Gibco BRL, Zusammensetzung siehe Kapitel 2.3) gestoppt. Nach einem Zentrifugationschritt von 12 min bei 4 °C und 800 Umdrehungen pro min (UpM) wurde der Überstand abgenommen und dem Zellpellet DNase sowie serumhaltiges DMEM hinzugefügt. Es folgte die mechanische Dissoziation des Gewebes mit Hilfe einer hitzepolierten Pasteurpipette. Nach erneuter Zentrifugation (12 min / 4 °C / 800 UpM) wurde der Überstand entfernt und das Zellpellet mit 10 ml serumhaltigem DMEM gewaschen und nochmals zentrifugiert (12 min / 4 °C / 800 UpM). Dem Zellpellet wurde eine geeignete Menge serumhaltiges DMEM hinzugefügt (10 ml / Gehirn). Jeweils 10 ml dieser Zellsuspension wurden in eine mit Poly-L-Lysin (PLL, Sigma, 100 µg / ml) beschichtete Kulturflasche (Grundfläche 75 cm<sup>2</sup>, Nunc, Deutschland) gegeben. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub>, 95 % Luft und 95 % Luftfeuchtigkeit. Am folgenden Tag wurden die Kulturen zweimal mit serumhaltigem DMEM gewaschen. Nach fünf bis sieben Tagen hat sich in der Kultur ein konfluenter Astrozytenmonolayer entwickelt, auf dem sich schwach adhärente Mikrogliazellen befanden.

Die Mikroglia konnten durch Schütteln der Kulturflaschen von dem Astrozytenmonolayer abgelöst und zur weiteren Kultivierung aufgearbeitet werden (siehe Kapitel 2.1.2). Durch das Entfernen der Mikroglia erhielt man eine zu mindestens 95 % reine Mikroglia kultur. Die abgeschüttelten Mikroglia (siehe Kapitel 3.1.1) wurden für 10 min zentrifugiert (10 min / 4 °C / 800 UpM) und das Zellpellet resuspendiert. Die Zellzahl wurde mittels Trypanblaufärbung in einer Thomakammer in serumfreiem Medium bestimmt. Trypanblau (3,3’-[dimethyl-4,4-biphenylen bis(azo)]bis-(5-amino-4-hydroxy-2,7-naphtalin-disulphonische-Säure)-tetranatrium Salz; Sigma-Aldrich, USA) ist ein membranimpermeabler Farbstoff, welcher ausschließlich geschädigte bzw. tote Zellen anfärbt. Die Zellen wurden in einer Dichte von 2 x 10<sup>5</sup> Zellen pro Well in 24 -Well Platten (Greiner, Deutschland) oder in einer Dichte von 1 x 10<sup>6</sup> Zellen in 6-Well Platten (Greiner, Deutschland) ausgesät. Für RNA- und Prote-

ingewinnung wurden die Zellen auf dem Gefäßboden der Wellplatten und für immunzytochemische Untersuchungen auf PLL beschichteten Glasplättchen kultiviert.

### 3.1.2 Primäre Neurone

Primäre Neurone wurden aus 20 Tage alten C57BL/6J Embryonen gewonnen. Das Muttertier wurde durch Genickbruch getötet, der Uterus mit den darin enthaltenen Embryonen entfernt und in eine Petrischale mit gekühltem HBSS überführt. Wie bei der Herstellung der Gliakulturen wurden die Hirnhäute entfernt, jedoch nur die beiden Kortexhälften weiterverwendet. Die Gewebestücke wurden dreimal mit 5 ml HBSS in 15 ml Falconröhrchen (6 Kortexhälften pro Falconröhrchen) gewaschen. Die enzymatische Dissoziation erfolgte mit Trypsin (0,3 % in drei ml HBSS) für 30 min bei 37 °C. Durch Zugabe von 2 ml FKS wurde der Verdau gestoppt und die Kortexhälften dreimal mit Neuro-Basalmedium (NBM, Gibco BRL, Zusammensetzung siehe Kapitel 3.3) gewaschen. Die mechanische Dissoziation der Zellen erfolgte mit einer hitzepolierten Pasteurpipette. Anschließend wurde auf 10 ml mit NBM aufgefüllt, leicht geschwenkt und die Röhrchen für 1 min stehen gelassen, damit noch vorhandene Zellklumpen sich absetzen konnten. Die Überstände mit den Zellen wurden in einem neuen Röhrchen gesammelt, zentrifugiert (5 min / 4 °C / 1200 UPM) und das Zellpellet in NBM resuspendiert. Die Neurone wurden in einer Zelldichte von  $4 \times 10^4$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  für immunzytochemische Untersuchungen und  $2 \times 10^5$  Zellen pro  $\text{cm}^2$  für Protein- oder RNA-Isolationen in 6-Well Platten kultiviert. Die Kultivierung der Zellen erfolgte bei 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>, 95 % Luft und 95 % Luftfeuchtigkeit.

## 3.2 Stimulation von Zellkulturen

Die Stimulation der Zellen (Mikroglia, Astrozyten, Neurone) erfolgte für 24 h. Die für die Stimulation verwendeten Substanzen und Konzentrationen sind in Tabelle 2 aufgeführt. Als Kontrollen wurden unbehandelte Kulturen verwendet.

**Tabelle 2: Für die Stimulation der Zellkulturen verwendete Substanzen.**

Substanz	Endkonzentration	Hersteller
IFN- $\gamma$	1000 Units / ml	PeptoTech EC LTD, London, UK
TNF- $\alpha$	1 ng / ml	R&D Systems, St. Katharinen, Deutschland
TNF- $\alpha$	5 ng / ml	R&D Systems, St. Katharinen, Deutschland
LPS	10 ng / ml	Sigma Deisenhofen, Deutschland
LPS	100 ng / ml	Sigma Deisenhofen, Deutschland
IFN- $\gamma$ + TNF- $\alpha$	1000 U / ml + 5 ng / ml	PeptoTech EC LTD, R&D Systems

### 3.3 Verwendete Nährmedien und Puffer

#### ***Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium (DMEM)***

Das serumhaltige Kulturmedium DMEM mit 10 % fötalem Kälberserum (FKS) wurde sowohl für die Primärkulturen als auch für die 96 Well Mikrotiterplatten und bei der Kultivierung von Mikroglia und Astrozyten auf Deckgläschen verwendet.

DMEM: (Life Technologies/Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)

Penicillin: 50 U / ml (Seromed/Biochrome, Berlin, Deutschland)

Streptomycin: 50 µg / ml (Seromed/Biochrome, Berlin, Deutschland)

L-Glutamin: 2 mM (Seromed/Biochrome, Berlin, Deutschland)

Fötales Kälberserum (FKS): 0,1 ml / ml DMEM (Life Technologies/GibcoBRL)

Der pH-Wert von 7,3 stellte sich durch die Begasung mit 5 % CO<sub>2</sub> ein und blieb während der Inkubation mit CO<sub>2</sub> konstant.

#### ***Neuro basal Medium (NBM)***

Für die Kultivierung primärer Neurone wurde als Grundsubstanz NBM (GibcoBRL) verwendet und wie folgt supplementiert:

NBM: 96 ml (Life Technologies/Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)

B27: 2 ml (Gibco BRL, Deutschland)

Gentamycin: 1 ml (Gibco BRL, Deutschland)

Glutamin: 2 mM (Böhringer Mannheim, Deutschland)

Der pH-Wert von 7,3 stellte sich durch die Begasung mit 10 % CO<sub>2</sub> ein und blieb während der Inkubation mit CO<sub>2</sub> konstant.

#### ***Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI 1640)***

RPMI 1640 : (Life Technologies/Gibco BRL, Eggenstein, Deutschland)

Das Medium RPMI wurde analog zu dem in Kapitel 2.3.1 beschriebenen DMEM angesetzt.

#### ***PBS (Phosphate buffered saline)***

Natriumphosphat: 0,1 M (Sigma-Aldrich, USA)

NaCl: 8,76 g/l (Sigma-Aldrich, USA)

KCl: 200 mg/l (Sigma-Aldrich, USA)

Aqua bidest: auf 1000 ml auffüllen

### 3.4 Messung der Stickstoffmonoxyd (NO)-Produktion

Dieser Test wurde zur Bestimmung der Akkumulation von Nitrit ( $\text{NO}_2$ ) als Abbauprodukt von NO im Medium von Zellkulturen verwendet. Für diesen Test wurden Mediumüberstände von Zellkulturen verwendet, die wie in Kapitel 3.2 stimuliert wurden. Als Kontrolle dienten die Medien unstimulierter Zellen. Das Medium wurde 1:1 mit Griess-Reagenz versetzt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die optische Dichte wurde mit Hilfe eines „Enzyme linked immune sorbend assay reader“ (ELISA-Reader; ELx800, Bio-Tek Instruments, Göttingen, Deutschland) bei einer Wellenlänge von 550 nm bestimmt. Der Mittelwert der Extinktionswerte der Proben wurde prozentual auf den Mittelwert der Extinktion der Kontrolle bezogen.

### 3.5 Tierstämme und Haltung

Die Mäuse wurden bei einem Licht-Dunkelrhythmus von 12 Stunden unter freiem Zugang zu Wasser und Futter gehalten. C57BL/6J Mäuse wurden in dem institutseigenen Tierstall gezüchtet. Mäuse des SJL-J Stammes wurden von der Firma Charles River (Deutschland) bezogen.

### 3.6 Die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis (EAE)

Für die EAE Versuche wurden 6 Wochen alte weibliche SJL Mäuse (Charles River) verwendet. Die EAE wurde durch Injektion des in Tabelle 3 zusammengefassten Immunisates ausgelöst. Das Ansetzen des Immunisates erfolgte in zwei Glasspritzen (10 ml, Poulsen und Graf, Deutschland), welche über einen 3-Wegehahn verbunden waren. In eine der Spritzen wurden die in Tabelle 3 beschriebenen Substanzen gegeben und die gesamte im System vorhandene Luft über den Drei-Wege-Hahn abgelassen. Das nun luftfreie Öl-Wassergemisch wurde für mindestens 10 min durch wechselseitiges Drücken der Kolben zu einer Emulsion vermischt, welche für die Immunisierung verwendet wurde. Den Tieren wurden an vier Stellen im Rücken, jeweils ungefähr 3 mm oberhalb der Extremitäten je 50  $\mu\text{l}$  Immunisat subkutan gespritzt. Am Tag der Immunisierung und 2 Tage später erhielten die Tiere zusätzlich eine intraperitoneale Injektion Pertussistoxin (200 ng Pertussistoxin in 400  $\mu\text{l}$  PBS, List Biological Laboratories, USA).

**Tabelle 3: Zusammensetzung des EAE Immunisates.**

Substanz	Menge pro Maus	Hersteller
CFA (Complete Freundesches Adjuvanz)	100 $\mu\text{l}$	DIFCO-Laboratories, USA
PLP <sub>139-151</sub> (HSLGKWLGHDPKF-OH)	75 $\mu\text{g}$	Pepceuticals, England
Mycobakterium Tuberculosis (H37Ra)	200 $\mu\text{g}$	DIFCO-Laboratories, USA
PBS	100 $\mu\text{l}$	

Während der Versuchszeit wurden die Tiere täglich auf ihre motorischen Fähigkeiten hin untersucht. Wenn in einem Käfig ein Tier so starke Symptome aufwies, dass eine selbständige Ernährung nicht mehr möglich war, wurde sowohl Wasser als auch angefeuchtete Zellpellets auf den Käfigböden aller Käfige bereitgestellt.

Mit Hilfe eines Punkte-Systems wurden die klinischen Symptome der Tiere klassifiziert (siehe Tabelle 4). Einem gesunden Tier wurde der Wert Null zugeordnet. Mäuse, die motorische Ausfallerscheinungen zeigten wurden in Schritten von 0,5 Punkte bewertet.

Tabelle 4: Angewendetes Punkte-System, zur Klassifizierung des Erkrankungsgrades

Punkte	Symptome
0,0	gesund
0,5	Schwanz Parese
1,0	Schwanz Paralyse
1,5	Hinterbein Parese (rutschen durch Gitter) Oder schwacher Aufrichtreflex aus Rückenlage
2,0	Hinterbein Parese (rutschen durch Gitter) Und schwacher Aufrichtreflex aus Rückenlage
2,5	auffällige Defizite beim Laufen auf ebener Oberfläche
3,0	Paralyse der Hinterbeine
3,5	leichte Vorderbein Parese
4,0	starke Vorderbein Parese (Tier kann die Vorderbeine nicht mehr von alleine beim Gittertest auf die Stäbe setzen)
4,5	Paralyse der Vorderbeine
5,0	Tod

### 3.6.1 EAE Verlauf unter IDO Inhibition

Um die immunsuppressive Funktion des Enzyms IDO unter EAE nachzuweisen, wurde die IDO-Aktivität kompetitiv durch 1-Methyl-Tryptophan (Sigma-Aldrich, USA) gehemmt. Die lokale Gabe von 1-Methyl-Tryptophan war nicht möglich, da es unter physiologischen Bedingungen nicht in ausreichender Konzentration (100  $\mu$ M) gelöst werden konnte. Daher wurde in PBS gelöste Amylose (2 %) als Trägerlösung für 1-Methyl-Tryptophan (50 mg / ml Trägerlösung) verwendet. In zwei 50 ml Spritzen, die über einen 3-Wegehahn miteinander verbundenen waren, wurde das 1-Methyl-Tryptophan mit der Trägerlösung homogen vermischt. Diese Lösung wurde anschließend auf 1 ml Diabetikerspritzen verteilt und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert. Als Kontrolle diente die Trägerlösung ohne 1-Methyl-Tryptophan.

Pro Versuch wurden 20 SJL Mäuse immunisiert und täglich auf motorische Symptome hin untersucht. War bei wenigstens 80% der immunisierten Tiere über zwei Tage mindestens eine Schwanzlähmung festzustellen, wurden die Tiere in zwei Gruppen eingeteilt. Diese Einteilung wurde so vorgenommen, dass jede Gruppe die gleiche Anzahl gleich stark erkrankter Tiere enthielt. War dies nicht möglich, wurden die Tiere so verteilt, dass der mittlere Score beider Gruppen weitgehend gleich war. Dabei wurde darauf geachtet, dass die Verteilung schwach und

stark erkrankter Tiere in beiden Gruppen so gut wie möglich übereinstimmten. Ab dem Tag der Gruppenbildung (zwischen Tag 10 und 12) bekamen die Tiere täglich subkutan 100 µl der Trägersubstanz (Kontrollgruppe) oder des Inhibitor-Emulgates injiziert. Die tägliche Erfassung der klinischen Symptome jeder Maus wurde von einer verblindeten Person durchgeführt.

Gewinnung von Gewebeproben

Transcardiale Perfusion

Die SJL Mäuse wurden 0, 4, 8, 12, 15 oder 26 Tage nach Immunisierung perfundiert. Mit einem Gemisch aus 20 % Ketamin (CuraMed GmbH, Karlsruhe, Deutschland) und 8 % Rompun (Bayer Vital GmbH, Frankfurt, Deutschland) gelöst in 0,8 % Natriumchlorid (100 µl / 10 g Körpergewicht) wurden die Mäuse betäubt, der Brustkorb eröffnet und das Herz freigelegt. Um einen Abfluss des Blutes und der Perfusionslösung zu ermöglichen, wurde der rechte Vorhof des Herzens eröffnet. In den linken Ventrikel wurde von der Herzspitze aus eine Kanüle eingeführt, die über einen Schlauch an eine Schlauchpumpe angeschlossen war. Über dieses Pumpensystem wurden 50 ml physiologische Kochsalzlösung (0,9 % NaCl) durch das Kreislaufsystem gespült.

Sollten Organe (Gehirn, Rückenmark, Milz und Lymphknoten) für die Gewinnung von RNA, Proteinen oder Lysaten verwendet werden, erfolgte deren Entnahme unverzüglich nach der Perfusion mit NaCl. Die vom Blut befreiten Proben wurden in flüssigem Stickstoff eingefroren. Blutproben wurden innerhalb der ersten 20 s der Perfusion mit einer Spritze direkt aus dem rechten Vorhof entnommen.

Für immunhistologische Untersuchungen folgte nach dem Ausspülen des Blutes mit physiologischer NaCl Lösung die Fixierung der Gewebe mit 4 % Paraformaldehyd (100 ml Paraformaldehyd pro Maus; Merck, Deutschland). Anschließend wurden die Organe (Gehirne und Rückenmark) entnommen und in 4 % Paraformaldehyd über Nacht bei 4 °C nachfixiert. Bis zum Anfertigen der Schnitte wurden die Gewebe in 0,1 M Phosphat Puffer (PB, pH 7,4) bei 4 °C aufbewahrt.

## **3.7 Molekularbiologische Methoden**

### **3.7.1 Ribonukleinsäure (RNA) Isolation**

Für die Isolation von Gesamt-RNA wurden Ribonuclease (RNase) freie Lösungen verwendet. Die Gesamt-RNA stellt die Summe aller in der Zelle vorhandenen RNA Moleküle dar. In ihr sind die ribosomale RNA (rRNA), die Transfer-RNA (tRNA) und die Boten-RNA (mRNA) enthalten.

Die Zellen einer Flasche wurden zwei mal mit „Phosphat-buffered Saline“ gewaschen und mit einem Zellschaber (Techno Plastic Products AG, Schweiz) in 10 ml PBS vom Flaschenboden abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein Falconröhrchen (15 ml) gegeben und zentrifugiert (10 min / 4 °C / 800 UPM). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet bei -20 °C eingefroren. Die Isolation der Gesamt-RNA erfolgte auf der Basis der Phenol-Chloroformtrennung unter Verwendung des phenolhaltigen Reagenz TRIzol (Applied Biosystems, Deutschland). Maximal 10 Millionen Zellen wurden mit 1 ml TRIzol durch 10-maliges ein- und ausstoßen in eine Pipette lysiert. Die RNA-Isolierung aus Geweben, erfolgte mit sterilen Einwegspritzen, unter Verwendung immer kleinerer Kanülen. Jedes Organ wurde in 1 ml TRIzol je 100 mg homogenisiert. Anschließend wurden 0,2 ml

Chloroform (Sigma-Aldrich, USA) hinzugefügt, mehrfach stark geschüttelt und 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Die Trennung von chloroform- und phenolhaltiger Phase erfolgte mittels Zentrifugation (4 °C / 12.000 UpM / 15min). Die obere (wässrige) Phase wurde vorsichtig mit einer Pipette abgezogen und in einem Verhältnis von 1:1 mit Isopropanol für die Fällung der RNA versetzt. Nach der Inkubation für 15 min auf Eis wurde die RNA-Lösung zentrifugiert (4 °C / 12.000 UpM / 15 min) und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde zweimal mit 70 % Ethanol und einmal mit 100 % Ethanol gewaschen, um Chloroform und Salze auszuwaschen. Die RNA wurde an der Luft getrocknet und in Reinstwasser (Aqua bidest) aufgenommen. Die Quantifizierung der RNA-Proben erfolgte mittels photometrischer Messung bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration wurde mit folgender Formel (Gleichung 1) bestimmt:

$$\text{Gleichung 1: } X[\text{mg} / \text{ml}] = \frac{\text{Verdünnungsfaktor} * E_{260} * 40}{1000}$$

$E_{260}$  : gemessene Extinktion bei 260 nm

Um zu starke Verunreinigungen der RNA mit Proteinen auszuschließen, wurden ausschließlich Proben verwendet, deren Koeffizient  $E_{260} / E_{280}$  zwischen 1,8 und 2,0 lag. Da diese Meßmethode eine Verunreinigung der Proben mit DNA nicht ausschließen kann, wurde als optische Kontrolle 1 µg der RNA-Proben mit einem 1 %igem Agarosegel bei 5 V / cm elektrophoretisch aufgetrennt und die Nukleinsäuren mit Ethidiumbromid angefärbt. Die Betrachtung der gefärbten Gele erfolgte auf einem Transilluminator mit UV-Licht. Zwei ribosomale rRNA Moleküle stellen die 18S-rRNA und 28S-rRNA dar. Diese beiden konnten bei nicht degradiert RNA als zwei diskrete Banden im Gel sichtbar gemacht werden. Stark verschmierte Banden wiesen auf verstärkten Abbau der RNA und somit für eine Verunreinigung der Probe hin. DNA-Verunreinigungen der Proben wurden durch eine Bande im hochmolekularen Bereich kurz unterhalb der Geltaschen sichtbar.

### 3.7.2 Komplementäre DNA (cDNA) Synthese

Für die Transkription der aus Zellen oder Geweben isolierten mRNA in cDNA wurden 2 µg Gesamt-RNA in 19 µl Aqua bidest und 2 µl Oligo-dT Primer gemischt (Tabelle 5). Um Sekundärstrukturen zu lösen, wurde dieses Gemisch für 10 min auf 75 °C erhitzt und anschließend sofort auf Eis abgekühlt. Bis auf die reverse Transkriptase (M-MLVRT, Promega, USA) wurden alle weiteren in Tabelle 5 angegebenen Substanzen hinzugegeben. Anschließend erfolgte der Desoxyribonuclease (DNase) Verdau (30 min / 37 °C). Die DNase wurde durch Erhitzen des Ansatzes für 5 min auf 75 °C inaktiviert. Die Transkription erfolgte nach Zugabe von 1 µl reverse Transkriptase für eine Stunde bei 42 °C und wurde durch Erhitzen auf 94 °C für 5 min abgestoppt. Als Kontrollen wurden identische Ansätze für die cDNA Synthese verwendet, jedoch ohne Zugabe von reverser Transkriptase. Wurde in diesen Ansätzen ein PCR-Produkt detektiert, konnte von einer DNA Verunreinigung ausgegangen werden, weshalb diese Proben nicht weiter bearbeitet wurden. Die Lagerung der cDNA erfolgte bei -20 °C.

**Tabelle 5: Für die PCR verwendete Chemikalien und Enzyme**

Substanz	Stamm-Konzentration	Volumen	Hersteller
Oligi-dT-Primer	0,1 µg/µl	2 µl	Promega, USA
5x Puffer	5 x	1 x	Promega, USA
DTT	0,1 M	4 µl	Invitrogen, Deutschland
dNTP	2,5 mM	4 µl	Promega, USA
DNase I	2 U/µl	1 µl	Ambion, USA
RNAsin	40 U/µl	0,5 µl	Promega, USA
M-MLVRT	200 U/µl	1 µl	Promega, USA

### 3.7.3 Polymerase Kettenreaktion (PCR)

Die PCR ermöglichte semiquantitative Aussagen über die Induzierbarkeit bzw. den Transkriptionsstatus einzelner Gene. Hierfür wurde das PCR Core System Kit von Promega (Promega Corporation, USA) verwendet. Die selektive Vervielfältigung von cDNA Sequenzen aus Geweben von Tieren oder Zellkulturen erfolgte mittels PCR und den in Tabelle 6 aufgeführten genspezifischen Primern. Die PCR-Produkte wurden zusammen mit dem Größenmarker  $\lambda$ -Pst in einem 1 %igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Mit Hilfe von Ethidiumbromid wurden die Nukleinsäurefragmente gefärbt. Die Fotodokumentation der Gele unter UV-Licht (INTAS, Deutschland) ermöglichte sowohl die Bestimmung der Größe der PCR-Produkte als auch deren relative Menge. Zur Überprüfung der Genspezifität wurden die PCR-Banden aus dem Gel ausgeschnitten und von der Firma Services in Molecular Biology (SMB, Berlin, Deutschland) sequenziert. Die erhaltenen Nukleotidsequenzen wurden mit bereits veröffentlichten Sequenzen der Datenbank des National Institute of Health (NIH; <http://www.ncbi.nih.gov>) überprüft.

Vor der Semiquantitativen PCR Analyse der IDO Transkripte in Geweben und Zellkulturansätzen wurden die cDNA-Proben auf einheitliche Nukleinsäurekonzentrationen eingestellt. Dies wurde durchgeführt unter Verwendung spezifischer Primer für das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin. Hierfür wurde zunächst getestet, ob in den zu vergleichenden Proben gleich starke  $\beta$ -Aktin Banden nach erfolgter PCR im Agarosegel gefunden werden konnten. War dies nicht der Fall, so wurden die cDNAs nicht weiter verwendet. Die verwendeten Temperaturen, Zyklen und Primer für  $\beta$ -Aktin und IDO sind in Tabelle 6 zusammengefasst.



**Tabelle 6: PCR Bedingungen und Sequenzen der verwendeten Primer**

	β-Aktin		IDO	
Initiale Denaturierung	94 °C / 5min		94 °C / 5,0 min	
Denaturierung	94 °C / 0,5min	x 30	94 °C / 0,5 min	x 35
Primer Bindung	62 °C / 0,5min		58 °C / 1,0 min	
Synthese	72 °C / 0,5min		72 °C / 2,0 min	
Finale Synthese	72 °C / 5min		72 °C / 5,0 min	
Primersequenz fw 5´→	CTAGGCACCAGGGTGTGATGG		GTACATCACCATGGTGTATG	
Primersequenz rw 5´→	CGTAGATGGGCACAGGTGGGG		GCTTTCGTCAAGTCTTCATTG	
	3H-ase		K-ase	
Initiale Denaturierung	94 °C / 5,0 min		94 °C / 5,0 min	
Denaturierung	94 °C / 0,5 min	x 35	94 °C / 0,5 min	x 35
Primer Bindung	58 °C / 0,5 min		58 °C / 1,0 min	
Synthese	72 °C / 0,5 min		72 °C / 2,0 min	
Finale Synthese	72 °C / 5,0 min		72 °C / 5,0 min	
Primersequenz fw 5´→	CTCTGTGGCCTTGTCTGTGA		GACATGCAAAGGGCTGTTTT	
Primersequenz rw 5´→	CCAGTGACAGCTCTCAACCA		CCCCGGGGATTAATTGTAGT	

### 3.7.4 Real Time PCR

Mittels der *real Time* PCR kann der Amplifizierungsprozess der durch die spezifischen Primer ausgewählten cDNA-Sequenz während der PCR beobachtet werden. Dies ermöglicht die sehr genaue Ermittlung der ursprünglich vorhandenen mRNA. Um dies zu erreichen, wurde das nur mit doppelsträngiger DNA interkallierende Fluorochrom SYBR-Green verwendet. Je größer die Menge der zu Beginn der Reaktion vorhandenen Ziel cDNA war, desto schneller erreichte das Fluoreszenzsignal den Schwellwert. Der PCR Zyklus bei dem dieser Schwellwert erreicht wurde, wird als Schwellwertzyklus ("cycle treshold" Ct) bezeichnet. Der Vergleich der einzelnen Ct-Werte verschiedener cDNA Proben ermöglicht die semi-quantitative Ermittlung der in der cDNA vorhandenen Zielsequenzen. Für die quantitative PCR wurden cDNA Proben aus Geweben von EAE immunisierten- und Kontrollmäusen verwendet (siehe Kapitel 3.8.1 und 3.8.2). Alle quantitativen PCRs wurden mit dem ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, USA) in 96 Well Platten (ABI PRISM optical

96-well plates, Applied Biosystems) durchgeführt. Die Primer wurden so gewählt, dass für alle Reaktionen die gleichen Reaktionsbedingungen verwendet werden konnten (40 Zyklen, 20 s / 95 °C, 60 s / 60 °C, 30 s / 74 °C) und das PCR Produkt eine Länge von 100 bis 200 Basenpaaren besaß (Tabelle 7). Die Reaktionen wurden mit je 5 µl cDNA angesetzt; für den Nachweis des Haushaltgens GAPDH wurden je 5 µl der zuvor mit Wasser 1 zu 30 verdünnten cDNA verwendet. Das Endvolumen der Reaktionsansätze betrug 30 µl, die sich wie folgt zusammensetzten: 5 µl cDNA 15pmol je Primer (2 x 1 µl), 15 µl 2x SYBR-Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, USA) und 8µl Wasser. Jede Reaktion wurde als Dreifachmessung angesetzt, und dreimal mit cDNA Proben aus voneinander unabhängigen Versuchen (n=3) durchgeführt. Die Auswertung der gewonnenen Daten erfolgte mittels ABI Prism 7000 SDS Software (Applied Biosystems, USA) und Excel (Microsoft, USA). Die ermittelten Expressionsunterschiede der einzelnen Proben wurden auf die GAPDH Werte jeder Probe normiert (Gleichung 2) und in der Auswertung als  $2^{-\Delta CT}$  logarithmisch aufgetragen. Als Negativkontrolle wurden 5 µl nicht revers umgeschriebener DNase verdauter RNA verwendet (siehe Kapitel 3.8.2).

**Gleichung 2: relative Expression** =  $2^{-(CT_{gen} - CT_{GAPDH})}$

**Tabelle 7: Für die quantitative PCR verwendete Primer**

Primer	Sequenz
IDO-fw 5'→	AGAGGATGCGTGACTTTGTGGAC
IDO-rw 5'→	GACCCCCTGATACATCAGACCTT
IL-10 fw 5'→	GGACAACATACTGCTAACCGACTCCT
IL-10 rw 5'→	CTGCTCCACTGCCTTGCTCTTATT
IFN-γ fw 5'→	ACGGCACAGTCATTGAAAGCCTA
IFN-γ rw 5'→	CTCACCATCCTTTTGCCAGTTCC
INOS fw 5'→	GACGAGACGGATAGGCAGAGATTG
INOS rw 5'→	CCTGGGAGGAGCTGATGGAGTAG
GAPDH fw5'→	GCAACTCCCACTCTTCCACCTTC
GAPDH rw 5'→	CCTCTCTTGCTCAGTGTCTTCTGCT

## **3.8 Biochemische Methoden**

### **3.8.1 Protein Isolation und Western-Blot**

#### **3.8.1.1 Gewinnung der Proteinproben**

Zellkulturen:

Die in Kulturflaschen angezogenen primären Glia- und Neuronenkulturen wurden zweimal mit PBS gespült und mit einem Zellschaber unter Zugabe von 10 ml PBS vom Flaschenboden entfernt. Die Zellsuspension wurde zentrifugiert (4 °C / 800 UpM / 5 min). Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 100 µl 0,1 M Tris-HCL (Sigma-Aldrich, USA) mit 1 % Natrium-Dodecyl-Sulfat (SDS, Sigma-Aldrich, USA) pro Kulturflasche lysiert. Um die hochmolekulare DNA zu zerstören, wurden die Lysate in 1,5 ml Eppendorfröhrchen überführt und für fünf min im eisgekühlten Ultraschallbad belassen. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Proben bei – 20 °C gelagert.

Gewebeproben:

Die Lyse der Gewebeproben erfolgte unter Zugabe von 1,0 ml des oben genannten Lysepuffers (siehe Zellkulturen) je 100 mg Gewebe. Um den Zellverband aufzulösen, wurden Einmilliliter-Spritzen mit Kanülengrößen von 20 bis 26 Gauge verwendet. Waren keine Zellverbände erkennbar, wurde die Suspension zentrifugiert (4 °C / 10.000 UpM / 5min). Der Überstand wurde in ein neues Tube überführt und bei – 20 °C eingefroren.

#### **3.8.1.2 Bestimmung der Proteinkonzentration mittels BCA-Kit**

Für die Bestimmung der Proteinkonzentration der Proben wurde der BCA Kit (Bio Rad, USA) verwendet. Da dieser Nachweis zeit- und temperaturabhängig ist, wurde in jedem Test parallel eine Eichreihe (0 bis 20 µg / ml) aus Rinder Serum Albumin (BSA, Sigma-Aldrich, USA) bestimmt. Durch diese Eichreihen war es möglich, mittels linearer Regression die Proteinkonzentrationen der einzelnen Ansätze zu berechnen und diese untereinander zu vergleichen. 10 µl des zu bestimmenden Proteinlysates wurden in einem Verhältnis von 1:50 mit Aqua bidest versetzt und je 5 µl in eine 96-Well Platte gegeben. BCA-Puffer und Kupfersulfat (CuSO<sub>4</sub>)-Lösung wurden in einem Verhältnis von 50:1 gemischt und 95 µl den verdünnten Proteinlysaten hinzugefügt.

Die Wellplatten wurden für 30 min bei 60 °C inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte bei einer Wellenlänge von 562 nm in einem ELISA-Reader (EL<sub>x</sub>800, Bio-Tek Instruments, Götendorf, Deutschland). Anhand der mit Excel (Microsoft, USA) ermittelten BSA Eichreihe wurden die Proteinkonzentrationen der Gewebelysate bestimmt. Die Proteinkonzentration der Lysate wurde auf ein 1 µg / µl eingestellt.

#### **3.8.1.3 Proteingelelektrophorese**

Um die Proteine nach ihrer Größe aufzutrennen, wurde die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) verwendet. Hierbei werden die Proteine durch das stark denaturierende Detergenz SDS praktisch linearisiert, so dass Sekundär- und Tertiärstrukturen keinen Einfluss mehr auf die Wandergeschwindigkeit der einzelnen Proteine besitzen. Die Laufgeschwindigkeit hängt folglich ausschließlich von der Proteingröße ab.

Die Proteinproben wurden in einem Verhältnis von 4:1 mit 4x Probenpuffer gemischt. Anschließend wurden die Proben 5 min bei 96°C erhitzt und direkt auf Eis abgekühlt, um eine Aggregatbildung zu verhindern. Es wurden in jede Probestasche 20 µg Gesamtprotein aufgetragen. In jedem Gel wurde für die Bestimmung der Größe der

Proteine eine Probentasche mit 10 µl Markerproteinlösung (RPN 800, Amersham Life Science, England) gefüllt. Die Polyacrylamid-Gele wurden in einer Minigelkammer (Biorad, USA) den Anleitungen des Herstellers folgend gegossen und der Gellauf bei 50 V gestartet. Die Spannung wurde auf 80 V erhöht, sobald die Bromphenolfront die Grenze zwischen Trenn- und Sammelgel erreichte. Die Elektrophorese wurde beendet, sobald die Bromphenolfront aus dem Trenngel in die Puffertanks gelaufen war.

**4x Probenpuffer:**

3,2 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8 (Sigma-Aldrich, USA)

0,4 ml Glycerol (Roth, Deutschland)

4,0 ml SDS (20 %) (Sigma-Aldrich, USA)

2 ml 0,5 M EDTA (Sigma-Aldrich, USA)

0,4 g Dithiothreitol (DTT, Sigma-Aldrich, USA)

2 ml Bromphenolblau (1 %, Sigma-Aldrich, USA) )

**Sammelgel:**

0,5 M Tris-HCl, pH 6,8 (Sigma-Aldrich, USA)

4 % Acrylamid (Amresco, USA)

**Trenngelpuffer:**

1,5 M Tris-HCL, pH 8,8 (Sigma-Aldrich, USA)

10-15 % Acrylamid (Amresco, USA)

**10 x Elektrophoresepuffer:**

0,25 M Tris-HCl, pH 8,3 (Sigma--Aldrich, USA)

1,92 M Glycin (Roth, Deutschland)

1 % SDS (Sigma-Aldrich, USA)

### **3.8.1.4 Western-Blot**

Um die Proteine aus dem Gel auf eine Membran zu transferieren, wurde eine „Semidry-Blotapparatur“ (Biorad, USA) verwendet. Auf die untere Elektrode (Anode) kamen zwei Lagen in Transferpuffer (192 mM Glycin , Sigma-Aldrich, USA, 25 mM Tris, Sigma, 20 % Methanol, Roth, Deutschland) getränktes Wattmann-3 mm-Papier. Auf diese folgte eine Nitrozellulosemembran (Amersham, USA), auf die das Gel gelegt wurde. Bedeckt wurde dieser „Sandwich“ mit zwei Lagen Filterpapier. Bei allen Lagen wurde darauf geachtet, dass keine Luftblasen entstehen, die den Proteintransfer behindern. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte innerhalb von 15 min bei einer Spannung von 25 V. Nach dem Transfer wurde die Membran in Phosphat-gepufferten

Tween (PBT: PBS + 0,1 % (v/v) Tween 20, Sigma Aldrich, USA) überführt und bis zur Immunodetektion bei 4 °C maximal zwei Tage aufbewahrt.

#### *3.8.1.5 Immunodetektion auf Blotmembranen*

Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen der Membranen, wurden diese für mindestens eine Stunde in PBT mit 3% Milchpulver blockiert und in PBT gewaschen. Die primären Antikörper oder Antiseren wurden gemäß Tabelle 8 mit 1% Milchpulver enthaltendem PBT verdünnt, auf die Filter gegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Schüttler inkubiert. Am nächsten Tag erfolgten drei Waschschrte mit PBT für 10 min. Die Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper (Amersham Life Science, England) wurden in einem Verhältnis von 1:1000 verdünnt und für eine Stunde bei Raumtemperatur auf die Membranen gegeben. Ungebundene Sekundärantikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membranen entfernt. Die spezifischen Signale wurden mittels des „enhanced chemiluminescence“ (ECL) - Kits (Amersham Life Science, England) auf Röntgenfilmen (Hyperfilm ECL, Amersham Life Science, England) nachgewiesen. Hierfür wurden die im Kit enthaltenen Detektionslösungen A und B im Verhältnis von 40:1 gemischt und auf den Membranoberflächen verteilt. Die Filter wurden mit einer Klarsichtfolie abgedeckt, in eine Röntgenfilmkassette gelegt und ein Chemilumineszenzfilm aufgelegt. Für die Belichtung wurde die Kassette verschlossen. Die Belichtungszeiten lagen zwischen 1 bis 10 min. Durch Entwicklung der Filme konnten die spezifischen Proteinbanden nachgewiesen werden.

Das IDO-spezifische Antiserum wurde entsprechend unseren Vorgaben von der Firma Eurogentic, Seraing (Belgien) hergestellt. Die für die Immunisierung verwendeten Peptide entsprachen den Aminosäuren 7-21 (sptegsrri-ledhhi) und 366-380 (ptdgdksepsnves) der IDO-Peptidsequenz der Maus. Das Antiserum wurde in Bezug auf seine Spezifität mittels kompetitiver Peptidinhibition im Western-Blot als auch in der Immunocytochemie getestet.

**Tabelle 8: Im Western-Blot verwendeten Antikörper**

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Phospho-Stat1 (Tyr701) (Cell Signaling Technology, USA)	1 : 1000	anti-Kaninchen IG (Esel) Pferderettich Peroxidase gekoppelt (Amersham Life Science, England)	1 : 1000
Stat1 (9H2) (Cell Signaling Technology, USA)	1 : 1000	anti-Kaninchen IG (Esel) Pferderettich Peroxidase gekoppelt (Amersham Life Science, England)	1 : 1000
INOS (Sigma-Aldrich, USA)	1 : 2000	anti-Kaninchen IG (Esel) Pferderettich Peroxidase gekoppelt (Amersham Life Science, England)	1 : 1000
IDO Antiserum	1 : 1000	anti-Kaninchen IG (Esel) Pferderettich Peroxidase gekoppelt (Amersham Life Science, England)	1 : 1000

### **3.9 IDO Aktivitätsnachweis mittels hochauflösender Flüssigkeits-Chromatographie**

Um die Enzymaktivität der IDO nachzuweisen, wurde die hoch auflösender Flüssigkeits-Chromatographie („high performance liquid chromatography“: HPLC) verwendet. Mit der im Folgenden beschriebenen Methode (abgewandelt nach Laich et al., 2002) war es möglich, das IDO Substrat Tryptophan und das Abbauprodukt Kynurenin quantitativ zu bestimmen.

#### **3.9.1 Aufarbeitung von Proben für die HPLC-Messung**

##### **3.9.1.1 Medien aus Zellkulturexperimenten**

Die Zellkulturmedien wurden 1:1 mit 30 %iger Tri-Chlor-Essigsäure (Sigma-Aldrich, USA) vermischt. Die durch die Säure denaturierten Proteine wurden durch zwei Zentrifugationsschritte (4 °C / 12.000 UpM / 10 min) gefällt und verworfen. Die Überstände wurden bis zur Messung bei –20 °C gelagert.

##### **3.9.1.2 Gewebeproben**

Die, entnommenen Gewebe wurden gewogen und auf Eis aufgetaut (siehe Kapitel 3.7.1). Das Homogenisieren der Gewebe erfolgte in einem Glaspotter unter Zugabe von 3,6% Perchlorsäure (Roth, Deutschland) in einem

Verhältnis von 1 µl Perchlorsäure pro mg Gewebe. Nach zweimaliger Zentrifugation (4 °C / 12.000 UpM / 10 min) wurden die Überstände bis zur Messung bei –20 °C gelagert.

#### Quantitative Bestimmung von Tryptophan und Kynurenin mittels HPLC

Die verwendete Messapparatur bestand aus den im Folgenden beschriebenen Bauteilen, wobei die Aufzählungsreihenfolge dem Weg der verschiedenen Laufmittel entspricht.

Mit dem Pumpensystem „System Gold 126 Solvent Module“ (Beckman Coulter, USA) war es möglich, mit zwei Pumpen, von denen eine an zwei und eine an drei unterschiedliche Flaschen angeschlossen war, zwischen vier unterschiedlichen Lösungsmitteln zu wählen. In je einer Flasche befand sich der Elutionspuffer (15 mM Natriumacetat, 2,7 % Acetonitril, pH 4,0 Laich et al., 2001), Wasser (HPLC Grade, Fluka, Schweiz), Acetonitril (HPLC Grad, Fluka, Schweiz), Methanol (HPLC Grad, Fluka, Schweiz) und Methylenchlorid (HPLC Grad Fluka, Schweiz). Der Inhalt der Flaschen wurde über die Pumpen an den Probengeber „System Gold 808 Autosampler“ (Beckman Coulter, USA) weitergeleitet. Mit diesem Gerät war es möglich, die zu untersuchenden Proben automatisch nacheinander auf die Säule aufzutragen. Es folgte die für die zeitliche Auftrennung der in den Proben enthaltenen Moleküle verantwortliche „Ultrasphere XL-oD S“ „reversed Phase“ Säule (Beckman Coulter, USA). Die Füllung der Säule bestand aus einer mit hydrophoben Hydrokarbonketten beschichteten Silikatmatrix. Die Geschwindigkeit, mit der die einzelnen Moleküle einer aufgetragenen Probe die Säule passierten, war abhängig von deren Größe und Wechselwirkung mit der Matrixoberfläche. Dadurch erfolgte eine räumliche und zeitliche Trennung der einzelnen Substanzen. Hieraus ergaben sich für Tryptophan und Kynurenin substanzspezifische Zeiten (Retentionszeiten), zu denen diese mit den Detektoren nachgewiesen werden konnten. Nach dem Verlassen der Säule wurde Kynurenin mittels des „System Gold 166 Detektor“ (Beckman Coulter, USA) bei einer Wellenlänge von 360 nm nachgewiesen. Vor der Säule wurden hydrostatische Drücke von bis zu 4 bar erreicht. Ein schnelles Abfallen dieser Drücke hinter der Säule würde zu der Ausdehnung kleinster Luftblasen führen. Luftblasen innerhalb der Meßküvette des UV Detektors verfälschen die Messwerte. Um solche Störungen zu verhindern, war direkt hinter dem UV-Detektor ein volumenarmer Rückdruckgeber (Beckmann Coulter, USA) angeschlossen. Für die Detektion von Tryptophan wurde der Fluoreszenzdetektor RF 10 AxL (Shimadzu, Japan) verwendet. Die Messung erfolgte bei einer Anregungswellenlänge von 286 nm und einer Emissionswellenlänge von 366 nm.

Die Auftrennung der Proben erfolgte bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 0,9 ml / min unter Verwendung des Elutionspuffers. Im Anschluss an jede Messung wurde die Säule mit dem in Abbildung 7 beschriebenen Protokoll gewaschen (9-18 min) und anschließend für die folgende Messung mit dem Elutionspuffer äquilibriert (18-20 min). Um die Bindungsfähigkeit der Säule zu gewährleisten und eventuelle Verunreinigungen zu entfernen, wurde diese nach 100 Messungen gereinigt. Hierfür wurde bei einer Durchflussgeschwindigkeit von 2 ml / min für je 10 min 100 % Wasser, 100 % Methanol, 50 % Methanol / 50 % Methylenchlorid, 100 % Methanol und 100 % Wasser über die Säule gegeben.



**Abbildung 7: Graphische Darstellung des HPLC-Elutionsprotokolls**

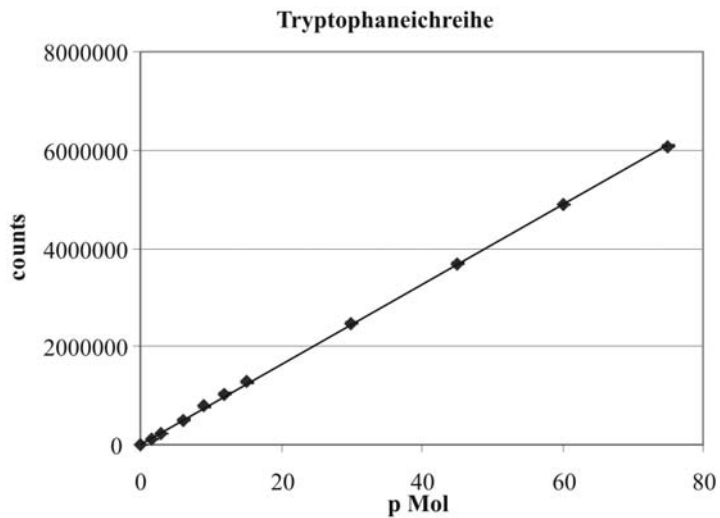
Darstellung des für die HPLC verwendeten Elutions- und Waschgradienten. Auf der x-Achse ist der prozentuale Anteil des Laufmittels B (Elutionspuffer oder Wasser) angegeben und über die Zeit aufgetragen. 0% Laufmittel B entsprechen somit 100% Laufmittel A (Acetonitril). Die Rauten stellen die Zeiten dar, zu denen entweder zwischen den Laufmitteln Wasser und Elutionspuffer gewechselt wurde, oder die Start- und Endpunkte der Waschgradienten. Zum Zeitpunkt 0 wurde die Probe auf die Säule gegeben und analysiert. Nach Abschluss der Analysephase (9min) wurde für zwei min mit Wasser gespült und anschließend mit einem aufsteigenden Gradienten bis 100% Acetonitril gewaschen. Nach 2 min reinem Acetonitril erfolgte wieder die Äquilibration der Säule zunächst in Wasser und anschließend für zwei min mit Elutionspuffer.

Die Verwendung des Messprotokolls ergab für Kynurenin eine Retentionszeit von 2,8 min ( $\pm 4$  s) und für Tryptophan eine Retentionszeit von 6,0 min ( $\pm 5$  s). Für die Erstellung der Eichgeraden wurden Standardlösungen mit steigenden Kynurenin und Tryptophankonzentrationen (0,0; 0,5; 1,0; 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0; 15,0; 20,0 und 25  $\mu$ M) in Natriumacetatpuffer angesetzt. Die beiden Substanzen lagen in den Eichstandards gemischt in gleichen Konzentrationen vor, um wie in den späteren Experimenten innerhalb einer Messung beide Stoffe zu bestimmen. Jede Messung wurde dreifach durchgeführt. In Abbildung 8 ist die Eichgerade für Tryptophan und in Abbildung 9 die Eichgerade für Kynurenin dargestellt. Mittels linearer Regression konnten für die beiden Substanzen folgende Gleichungen ermittelt werden:

Tryptophan:  $C_{[\text{pMol}]} = 81597 \times \text{Fl}_{366}$  Standardabweichung =  $\pm 1,0 \%$

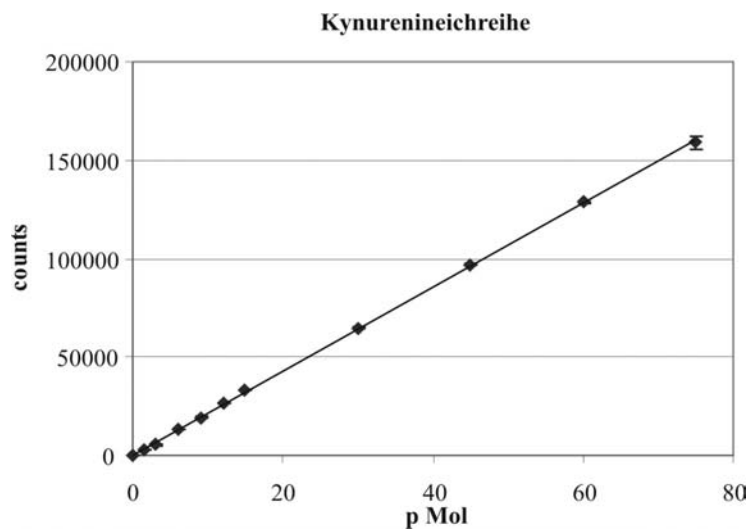
Kynurenin:  $C_{[\text{pMol}]} = 2136 \times \text{ED}_{360}$  Standardabweichung =  $\pm 1,3 \%$





**Abbildung 8: Eichgerade zur Tryptophanbestimmung**

Eichgerade für die Konzentrationsbestimmung von Tryptophan, das Integral des gemessenen Peaks (counts) ist in Abhängigkeit zur injizierten Stoffmenge in pMol aufgetragen.



**Abbildung 9: Eichgerade zur Kynureninbestimmung**

Eichgerade für die Konzentrationsbestimmung von Kynurenin, das Integral des gemessenen Peaks (counts) ist in Abhängigkeit zur injizierten Stoffmenge in pMol.

## **3.10 Immunzytologie und Histologie**

### **3.10.1 Vibratomschnitte**

Mit Hilfe des Vibratoms (Technical Products International, USA) wurden von den fixierten Organen (siehe Kapitel 3.7.1) Schnitte mit einer Dicke von 50 µm hergestellt. Die Schnitte wurden in 24 Well Platten, die mit 0,1 M PB gefüllt waren, gesammelt.

#### **3.10.1.1 Paraffinschnitte**

Für die Herstellung von Paraffinschnitten wurden die formalinfixierten Organe (siehe Kapitel 3.7.1) für 24 Stunden in Wasser und anschließend ebenfalls für 24 Stunden in 70 % Ethanol inkubiert. Die Entwässerung der Gewebe erfolgte für je drei Stunden in 96 % Ethanol, gefolgt von 100 % Ethanol und anschließend über Nacht in Methylbenzoat. Am nächsten Tag wurden die Präparate für eine Stunde bei 60 °C mit Methylbenzoat-Histowachs inkubiert und über Nacht bei 60 °C in reinem Histowachs äquilibriert. Am nächsten Tag erfolgte das Einbetten der Organe in Histowachs, die bis zum Schneiden bei Raumtemperatur gelagert wurden. Die Schnitte wurden an einem Schlittenmikrotom (Jung SM 200R, Leika, Deutschland) in einer Dicke von 10 µm hergestellt und auf gelatinierte Objektträger aufgezogen.

#### **3.10.1.2 Entparaffinierung von Schnitten**

Um die Paraffinschnitte zu färben, war es notwendig, das Paraffinwachs zu entfernen; hierfür wurden die Schnitte durch eine absteigende Alkoholreihe (2 x 10 min Xylol, 2 x 2 min Ethanol 100 %, 2 x 2 min Ethanol 96 %, 2 min Ethanol 80 %, 2 min Ethanol 70 %, 5 min 60 % Ethanol) gewässert und abschließend in PBS überführt.

### **3.10.2 Immunhistochemische Färbungen**

Immunhistochemische Hämatoxylin-Eosin- (HE) Färbungen wurden an 10 µm dicken Paraffinschnitten auf Objektträgern durchgeführt. Die Objektträger wurden für 10 min in einer Küvette mit Hämalaun (nach Meier; Dr. Hollborn und Söhne, Deutschland) belassen, anschließend für 10 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen und 30 s in einer Eosin Lösung (0,04 % Eosin, 1 % Ethanol, 0,25 % Eisessig) gefärbt. Nachdem die Präparate kurz in destilliertem Wasser gespült wurden, erfolgte die Entwässerung der Präparate in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 %, 96 %, 100 %) für je 2 min. Nach 5 weiteren min in reinem Xylol wurden die Schnitte in Entellan eingebettet und mit Deckgläschen bedeckt.

### **3.10.3 Immunzytochemische Färbungen**

Für die immunzytochemische Charakterisierung der Schnittpräparate wurde der Antigennachweis sowohl mittels indirekter Immunfluoreszenz (a) als auch mit der Diaminobenzidin (3,4,3',4'-Tetraaminobiphenyltetrahydrochlorid) (DAB) Färbung durchgeführt. Die immunzytochemische Detektion von Mikroglia und Makrophagen erfolgte mittels des fluoreszenzmarkiertem Lektins GFSB4 (Griffonia simplyfolia Isolektin B4, Sigma-Aldrich, USA) und die Detektion von Astrozyten durch GFAP (DAKO Diagnostik GmbH, Hamburg, Deutschland). Für den Nachweis IDO exprimierender Zellen wurde das in Kapitel 2.9.1.5 beschriebene polyklo-

nale Antiserum verwendet. In Tabelle 9 sind die verschiedenen primären Antikörper, ihre Verdünnungen sowie die verwendeten Sekundärantikörper zusammengefasst.

a) Fluoreszenzfärbungen:

Um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren, wurden die Schnitte zuerst 10 min mit 10 % Ziegen Serum (NGS, Difco, USA) in 0,1 M Phosphatpuffer (PB, pH 7,0) inkubiert, durch die Zugabe von 0,5 % Triton X-100 wurde die Permeabilität der Präparate erhöht. Nach zweimaligem Waschen in 0,1 M Phosphat Puffer (PB) erfolgte die Bindung des ersten Antikörpers (siehe Tabelle 9) in PB mit 1 % NGS, 3 % Triton X-100 für eine Stunde. Nach dreimaligem Waschen in 0,1 M PB folgte die Bindung des markierten Sekundärantikörpers (siehe Tabelle 9) für 1 Stunde bei Raumtemperatur. Nach erfolgter Färbung wurden die Schnitte mit Immumount (Thermo Shandon, USA) eingedeckelt und bis zur mikroskopischen Untersuchung bei 4 °C gelagert. Um ein Ausbleichen der Fluoreszenzfarbstoffe durch Licht zu verhindern, wurden die Präparate in Aluminiumfolie eingewickelt.

b) Diaminobenzidin Färbungen:

Um endogene Peroxidasen abzusättigen, wurden die Schnitte mit 3% Wasserstoffperoxid in 0,1 M PB für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach 3 Waschschritten in PB erfolgte die Blockierung unspezifischer Bindungsstellen mittels Inkubation in 0,1 M PB (10 % NGS, 0,5 % Triton X-100). Es folgten 3 Waschschrritte in PB und die Bindung des primären Antikörpers in 0,1 M PB mit 1 % Serum über Nacht. Der biotinylierte Sekundär-Antikörper wurde nach dreimaligem Waschen in 0,1 M PB gebunden (2 Stunden) gefolgt von 3 Waschschrritten mit 0,1 M PB. Es folgte die Bildung des Avidin:Biotin:Peroxidase Komplexes (ABC Lösung, Vectastain Elite ABC Kit, Linaris Biologische Produkte GmbH, Wertheim, Deutschland) in einer Verdünnung von A 15 µl und B 15 µl je ml für 45 min bei Raumtemperatur. Die Farbreaktion wurde unter optischer Kontrolle mit dem Peroxidasesubstrat DAB (Sigma-Aldrich, USA; 700 µl DAB (1 %) in 10 ml PB mit 6 µl 0,3% Wasserstoffperoxid) durchgeführt. Wiesen die Schnitte eine leichte Braunfärbung auf, wurde die Farbreaktion durch mehrfaches Spülen mit 0,1 M PB abgebrochen. Die Schnitte wurden über Nacht getrocknet und am nächsten Tag mit einer aufsteigenden Ethanolreihe (60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %) entwässert, in Entellan eingedeckelt und lichtmikroskopisch untersucht.

**Tabelle 9: Antikörper und verwendete Verdünnungen**

Primärantikörper / Antiserum	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Kaninchen anti IDO Antiserum (Eurogentic, Belgien)	1 : 200	biotinylierte anti Kaninchen IgG Antikörper (Linaris, Deutschland)	1:250
Kaninchen anti Maus aktivierte Caspase 3 (R&D System, USA)	1 : 250	biotinylierte anti Kaninchen IgG Antikörper (Linaris, Deutschland)	1:250
Kaninchen anti Maus GFAP (R&D System, USA)	1 : 400	biotinylierte anti Kaninchen IgG Antikörper (Linaris, Deutschland)	1:250
Kaninchen anti Maus Iba1 (Wako Chemicals GmbH, Deutschland)	1: 1000	biotinylierte anti Kaninchen IgG Antikörper (Linaris, Deutschland)	1:250

Sowohl Fluoreszenz- als auch Durchlichtaufnahmen wurden bei Objektträgerpräparaten an einem BX50 (Olympus, Deutschland) angefertigt. Aufnahmen in Zellkulturgefäßen erfolgten mit einem inversen Fluoreszenz- und Durchlichtmikroskop, IX70 (Olympus, Deutschland). An beiden Mikroskopen war eine Sensi Cam 3 (Kamera und Software, Olympus, Deutschland) für die Bildherstellung angeschlossen.

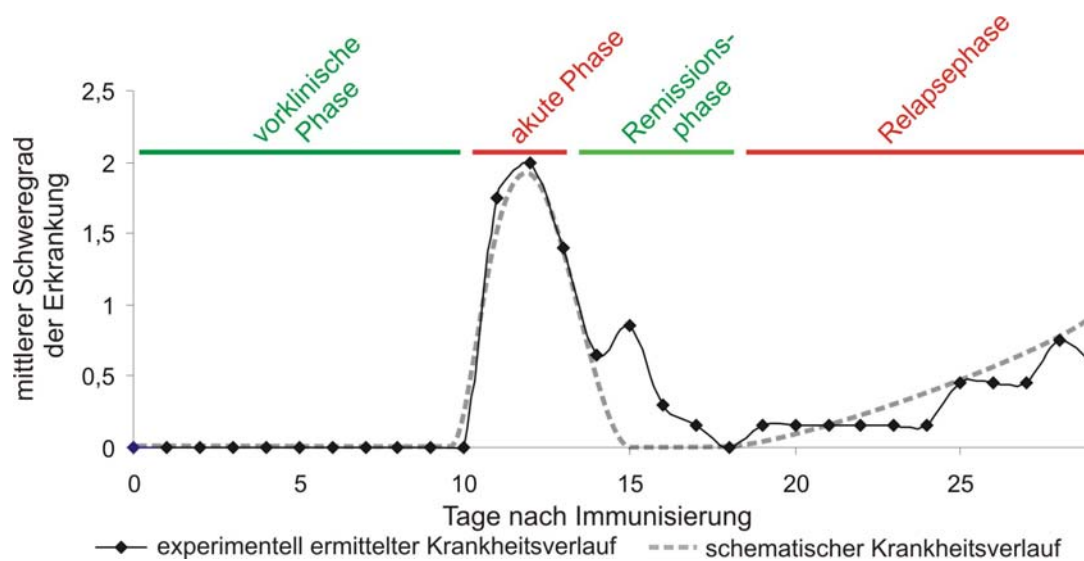
## 4 Ergebnisse

Das in der EAE von aktivierten Th 1 Zellen exprimierte proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$  induziert in Zellkultur in humanen Glioblastomzellen, Makrophagen, Fibroblasten (Daubener und MacKenzie 1999) und in dendritischen Zellen von Mäusen die Expression von IDO (Mellor et al., 2003). In aktuellen Arbeiten konnte ebenfalls die IDO Expression durch IL-10 Gabe auf reifen dendritischen Zellen gesteigert werden (Munn et al., 2002). Da seit 1998 eine immunregulatorische Funktion der IDO bekannt war (Munn et al., 1998), wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob die Expression von IDO an der Regulation der schubartigen ZNS Entzündung in der EAE beteiligt ist (siehe Kapitel 1.3.2).

### 4.1 IDO Aktivität während der EAE

Der typische klinische Verlauf des hier verwendeten EAE Modells (siehe Kapitel 3.6) ist in Abbildung 10 dargestellt. Innerhalb der ersten 10 Tage nach erfolgter Immunisierung (vorklinische Phase) sind keine motorischen Störungen der Mäuse zu beobachten. Auf die erste akute Phase (ab Tag 11 nach Immunisierung) mit starken motorischen Störungen folgte eine Remissionsphase (Tag 14-17). In dieser Phase weisen nur einzelne Tiere innerhalb einer Gruppe noch leichte Ausfallerscheinungen, wie zum Beispiel eine Schwanzlähmung, auf. Der Remissionsphase folgt eine chronisch progrediente Phase (Relapsephase), während der die Tiere sich kontinuierlich verschlechternde motorische Fähigkeiten aufweisen.

Um die unterschiedlichen klinischen Stadien der EAE in Bezug auf IDO zu untersuchen, wurden Blut, Milz, Großhirn, Rückenmark und Kleinhirn entnommen. Die gewählten Zeitpunkte der Entnahme waren 4 und 8 Tage nach Immunisierung, sowie während der akuten-, Remissions- und Relapsephase (Tabelle 10). Die Gewebe wurden homogenisiert und aufgearbeitet anschließend erfolgte mittels HPLC die Bestimmung des Kynurenin- und Tryptophangehaltes. Als Kontrollen dienten Blut und die entsprechenden Organe nicht behandelter Mäuse. Als Maß für die IDO Aktivität diente der Quotient vom Substrat Kynurenin zum Produkt Tryptophan (Widner et al., 1997).



**Abbildung 10: Einteilung der EAE in klinische Phasen**

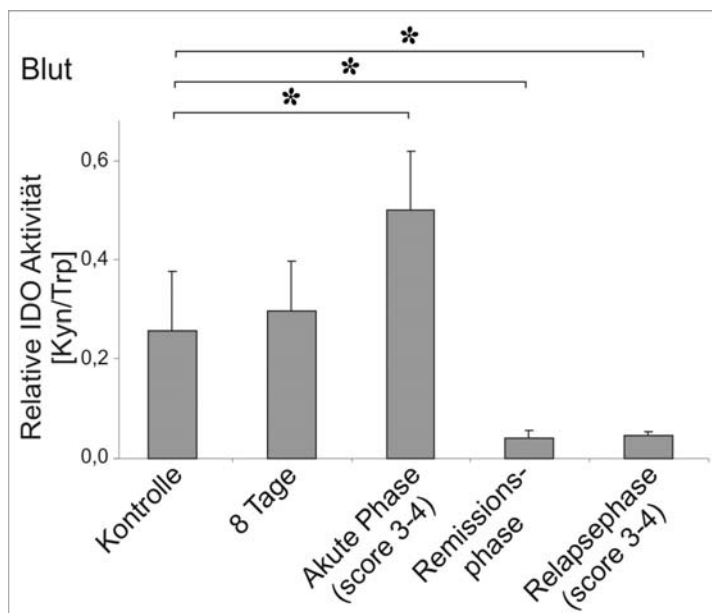
Darstellung des klinischen Verlaufs der aktiven EAE ab dem Zeitpunkt der Immunisierung. Innerhalb der vorklinischen Phase (Tag 0-10) weisen die immunisierten Tiere keine motorischen Auffälligkeiten auf. In der akuten Phase kommt es zu einer massiven Entzündung im Rückenmark, die durch starke Lähmungserscheinungen der Tiere deutlich wird. An diese erste klinische Phase schließt sich die Remissionsphase an, in der die ZNS Entzündung herunterreguliert wird, was klinisch in dem Aussetzen der motorischen Störungen sichtbar wird. In der Relapsephase kommt es zur erneuten Entzündung im ZNS, diese Phase verläuft chronisch progressiv.

**Tabelle 10: Zeitpunkte der Organentnahme nach EAE Immunisierung**

Tag der Organentnahme	EAE Phase	Klinische Punkte
0	Kontrolle	0
4	vorklinische Phase	0
8	vorklinische Phase	0
12	Akute Phase	2,5-3,5
15	Remissionsphase	0
26	Relapsephase	2,0-3,5

In den nachfolgenden Grafiken sind die Mittelwerte der relativen IDO Aktivität für die verschiedenen Organe von jeweils drei Mäusen dargestellt. Da sowohl in der akuten als auch in der Relapsephase die Tiere unterschiedlich starke klinische Symptome aufwiesen, wurden hierfür 3 Tiere mit den Krankheitsgraden 3,0, 3,5 und 4,0 verwendet. Statistisch signifikante Unterschiede wurden mit dem T-Test ermittelt ( $p < 0,05$ ) und mit einem Stern gekennzeichnet.

In den Blutproben immunisierter Mäuse (Abbildung 11) konnte 8 Tage nach Immunisierung, das heißt in der vorklinischen Phase, keine Änderung der relativen IDO Aktivität im Vergleich zu nicht immunisierten Kontrolltieren nachgewiesen werden. In der akuten Phase stieg die relative IDO Aktivität signifikant im Vergleich zur Kontrolle um  $94 \% \pm 47 \%$  an. In der Remissionsphase konnte hingegen eine signifikante Abnahme der relativen IDO Aktivität von  $85 \% \pm 7 \%$  im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden. Der Vergleich zwischen der relativen IDO Aktivität in der akuten Phase und der Remissionsphase ergab eine Reduktion um  $92 \% \pm 3 \%$ . Die IDO Aktivität in der Relapsephase blieb im Vergleich zur Remissionsphase unverändert (Abbildung 11).

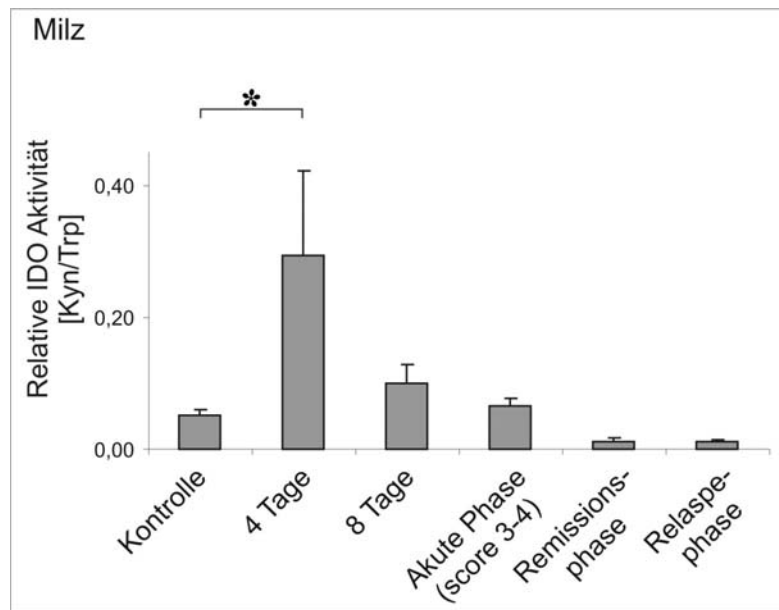


**Abbildung 11: Relative IDO Aktivität im Blut, im Verlauf der EAE**

Relative IDO Aktivität in Blutproben von nicht immunisierten Kontrolltieren, Tieren in der vorklinischen Phase (8 Tage, nach Immunisierung), während der akuten Phase, der Remissionsphase und der Relapsephase. In der akuten Phase der EAE ist die relative IDO Aktivität  $85 \% \pm 41$  größer als in der Kontrolle. Sowohl in der Remissions- als auch in der klinischen Relapsephase ging die ermittelte Enzymaktivität signifikant im Vergleich zur Kontrolle zurück.

Mit dieser Untersuchung konnte gezeigt werden, dass die IDO Aktivität während des Verlaufs der EAE reguliert wird. In der akuten Phase konnte eine Steigerung und in der anschließenden Remissionsphase eine Verringerung der Aktivität festgestellt werden. Während der Relapsephase, in der es wieder zum Anstieg von klinischen Symptomen in Mäusen kommt, findet man jedoch keinen Anstieg in der Aktivität.

In der Milz stieg 4 Tage nach der Immunisierung die relative IDO Aktivität signifikant um  $477 \% \pm 253 \%$  an. Ein signifikanter Unterschied konnte ebenfalls nach 8 Tagen gefunden werden ( $+ 97 \% \pm 56\%$ ), jedoch lag die Erhöhung der relativen IDO Aktivität unter der, die nach 4 Tagen gemessen worden ist. In der akuten Phase der EAE konnte in der Milz kein Unterschied in der relativen IDO Aktivität von immunisierten Tieren im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (Abbildung 12).



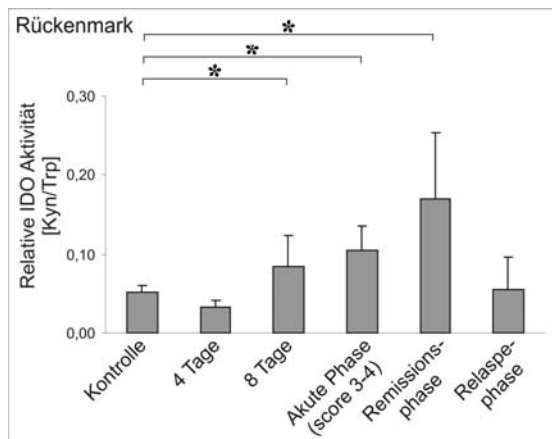
**Abbildung 12: Relative IDO Aktivität in der Milz im Verlauf der EAE**

Dargestellt ist die relative IDO Aktivität in der Milz nicht immunisierter und immunisierter Mäuse 4 und 8 Tage nach Immunisierung sowie in der akuten Phase. Vier Tage nach Immunisierung stieg die IDO Aktivität signifikant im Vergleich zur Kontrolle an. Acht Tage nach Immunisierung verringerte sich die Aktivität im Vergleich zur Aktivität nach 4 Tagen. Nach dem Auftreten der klinischen Symptome (akute Phase) lag die ermittelte Aktivität wieder auf dem Niveau gesunder Tiere.

Im Gegensatz zum signifikanten Anstieg des Kynurenin-Tryptophan Verhältnisses im Blut 8 Tage nach Immunisierung, konnte in der Milz bereits nach 4 Tagen eine Regulation festgestellt werden. Eine Erhöhung der relativen IDO Aktivität im Vergleich zur Kontrolle konnte nicht an den anderen untersuchten Zeitpunkten festgestellt werden.

Im Rückenmark konnte ein Anstieg der IDO Aktivität um  $66 \% \pm 76 \%$  8 Tage nach Immunisierung, also bereits vor dem Auftreten klinischer Symptome, gemessen werden (Abbildung 13). Der höchste Wert für die relative IDO Aktivität trat in der akuten Remissionsphase auf, hier stieg die relative IDO Aktivität auf  $336 \% \pm 165 \%$  an. Im Vergleich zu den Kontrollen war in der Remissionsphase kein signifikanter Unterschied nachweisbar ( $165 \% \pm 81\%$ ).

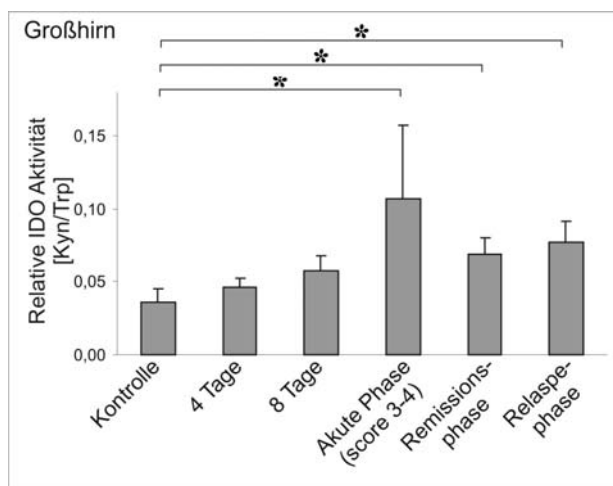




**Abbildung 13: Relative IDO Aktivität im Großhirn im Verlauf der EAE**

Im Rückenmark immunisierter Tiere konnte im Vergleich zur Kontrolle ein signifikanter Anstieg in der relativen IDO Aktivität ab dem 8. Tag nach Immunisierung nachgewiesen werden. Das Maximum der relativen IDO Aktivität lag während der Remissionsphase vor, während in der Relapsphase die Aktivität der nichtimmunisierten Kontrolltiere entsprach.

Ab der akuten Phase konnte im Vergleich zur Kontrolle im Großhirn ein signifikanter Anstieg der relativen IDO Aktivität nachweisen werden. Hier lagen die Werte für die akute Phase bei  $292 \% \pm 123 \%$ , in der Remissionsphase bei  $188 \% \pm 32 \%$  und in der chronischen Relapsphase bei  $211 \% \pm 42 \%$  im Vergleich zu den nicht immunisierten Kontrollen (Abbildung 14).



**Abbildung 14: Relative IDO Aktivität im Großhirn im Verlauf der EAE**

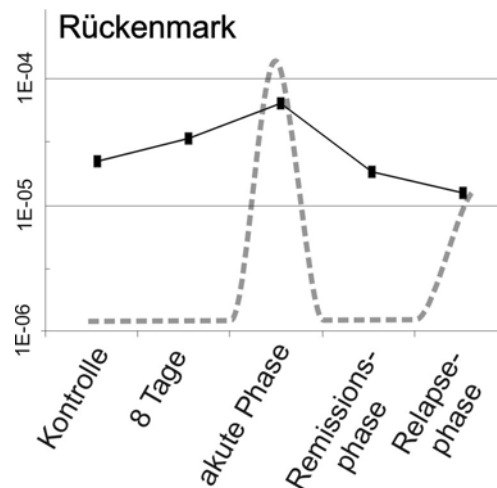
Im Großhirn stieg das Verhältnis zwischen Abbauprodukt und Substrat in der akuten Phase der Erkrankung signifikant an. Sowohl in der Remissions- als auch in der Relapsphase blieb die relative IDO Aktivität im Vergleich zu den Kontrollen erhöht, sie war jedoch geringer als während der akuten Phase.

Diese Daten zeigen, dass die IDO als enzymatisch aktives Protein in allen untersuchten Organen in Folge der Immunisierung verstärkt aktiv war. Die Regulation erfolgte in den untersuchten Organen nicht einheitlich, sondern während zeitlich und klinisch unterschiedlichen Phasen der Erkrankung.

#### 4.1.1 IDO mRNA Expression während der EAE

Da im entzündungsfreien Gewebe nichtimmunisierter Tiere nur sehr geringe Mengen an IDO-Transkript vorlagen, erfolgte die Bestimmung von IDO mRNA mittels der semiquantitativen *real time* PCR (siehe Kapitel 3.8.4). Die gemittelten  $\Delta$ CT-Werte von IDO gegen GAPDH entsprechen den relativen Menge an IDO mRNA im Rückenmark. Änderungen in der Menge der IDO mRNA während der unterschiedlichen Krankheitsphasen ließen sich so untereinander vergleichen.

Bereits 8 Tage nach Immunisierung, das heißt vor dem Auftreten der klinischen Symptome, steigt die Expression von IDO mRNA im Rückenmark an und erreicht ihr Maximum in der akuten Erkrankungsphase (Abbildung 15). Ein Anstieg an IDO Transkript konnte in der Remissions- und Relapsephase nicht nachgewiesen.



**Abbildung 15. IDO mRNA Expression im Verlauf der EAE**

Änderungen der IDO mRNA Mengen im Rückenmark im Verlauf der EAE. Dargestellt sind die  $\Delta$ CT-Werte gegen die Expression des Haushaltsgens GAPDH. Für jeden Zeitpunkt gingen drei Mäuse in die Untersuchung ein. Im Rückenmark geht die IDO mRNA Expression der klinischen Phase voraus. Die größte Menge an IDO Transkript konnte in akut erkrankten Tieren nachgewiesen werden, während sowohl in der Remissions- als auch in der Relapsephase keine erhöhte Menge an IDO mRNA nachgewiesen werden konnte. Der allgemeine klinische Krankheitsverlauf wurde in die Grafik als hellgraue gestrichelte Linie eingebettet.

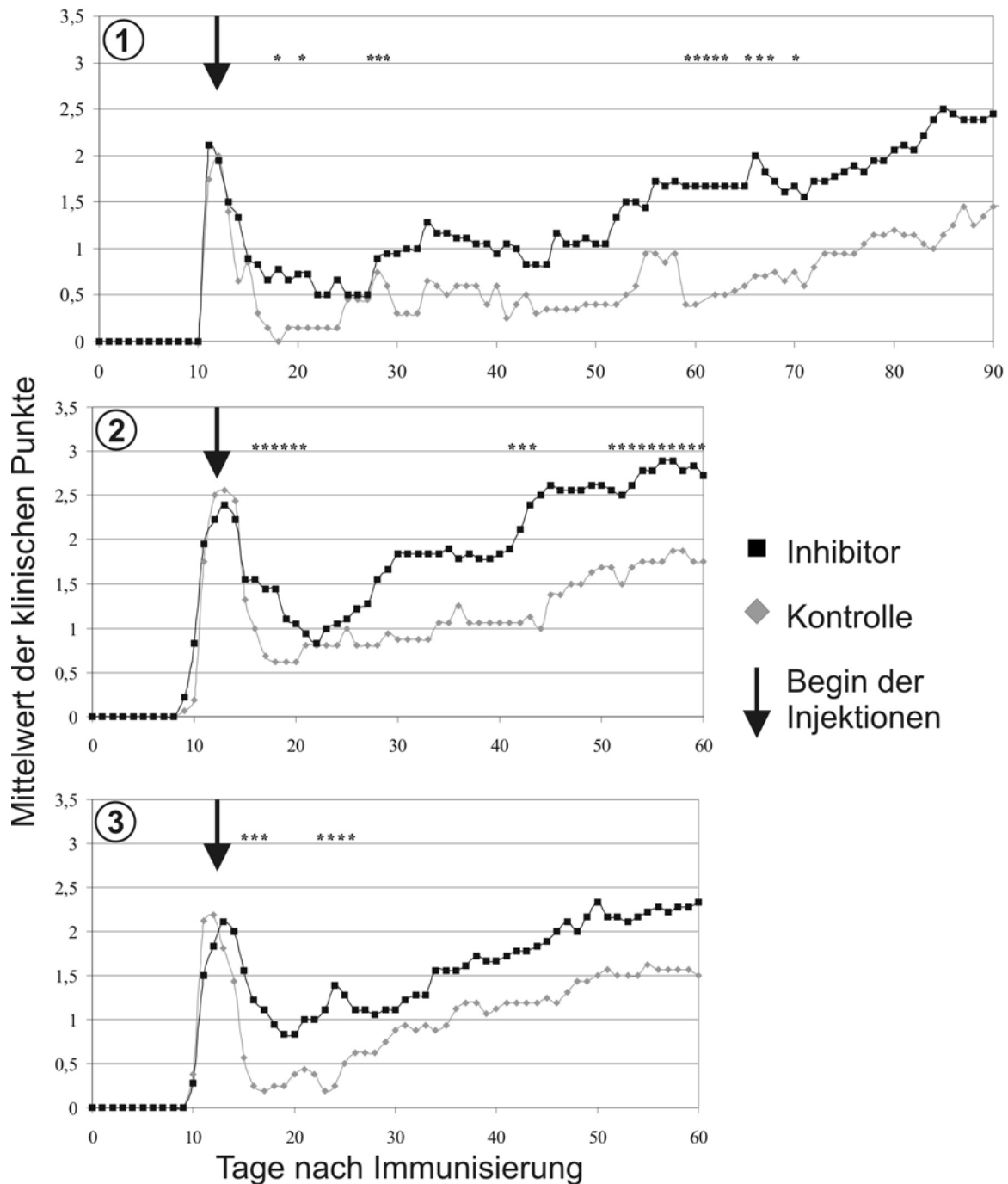
Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass aufgrund der autoimmunen Entzündung im ZNS IDO-mRNA verstärkt synthetisiert wird und dass diese verstärkte Neusynthese in der präklinischen- und akuten Phase der Erkrankung stattfindet.

## **4.2 Inhibition der IDO führt zu einer Verstärkung der EAE Erkrankung**

Die pharmakologische Inhibition der IDO mittels 1-Methyl-Tryptophan führt in vivo zum Zusammenbruch des Immunprivileges der Plazenta und somit zur Abstoßung allogener Embryonen (Munn et al., 1998). Die mögliche Bedeutung der IDO für die Kontrolle der Inflammation während der EAE wurde hier in analoger Weise durch in vivo Inhibition untersucht. des ZNS wurde untersucht. Dabei wurde der klinische Verlauf der EAE zwischen Mäusen, die entweder den IDO Inhibitor (1-Methyl-Tryptophan) oder lediglich die Trägersubstanz erhalten hatten, verglichen (Abbildung 16). Die Behandlung mit Inhibitor und Trägersubstanz erfolgte in der akuten klinischen Phase. Es gab zwei Gründe, warum dieser Zeitpunkt gewählt wurde: Erstens infiltrieren in diesem Stadium der Erkrankung autoreaktive Zellen das ZNS (Sobel et al., 1990). Zweitens konnte in dieser Arbeit eine erhöhte IDO Aktivität in der Milz bereits in der vorklinischen Phase festgestellt werden (siehe Kapitel 3.1). Um die Phase der Entstehung und Vermehrung autoreaktiver T-Zellen in der Peripherie nicht zu beeinflussen, erfolgte die Behandlung mit dem Inhibitor erst zum Zeitpunkt des Auftretens starker klinischer Symptome. Da während der akuten klinischen Phase die Leukozyten bereits in das ZNS eingewandert sind, wurde der Effekt der IDO Inhibition während der direkten zentralnervösen Entzündung untersucht.

Wurden den Tieren ab Tag 12 nach Immunisierung täglich 5 mg des IDO Inhibitors 1-Methyl Tryptophan injiziert, folgte auf die akute Phase zwar eine Erholungsphase, jedoch lagen hier die klinischen Ausfallerscheinungen signifikant höher als bei den Kontrollgruppen. Auch der weitere chronische Verlauf der Erkrankung war in den mit dem Inhibitor behandelten Tieren deutlich stärker (Abbildung 16).

In den drei unabhängig voneinander durchgeführten Versuchsreihen wiesen in den Kontrollgruppen 27 von 30 und in den mit Inhibitor behandelten Gruppen 26 von 30 Tieren klinische Symptome innerhalb des beobachteten Zeitraumes auf, was einer erfolgreichen Immunisierung von ca. 90% entsprach. In Bezug auf die Sterblichkeit waren keine Unterschiede zu verzeichnen. Insgesamt starben in den drei Versuchsreihen pro Gruppe 2 Tiere. Während der Remissionsphase konnte in allen unabhängig durchgeführten Experimenten (N = 3 mit 10 Tieren pro Gruppe) eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Verschlechterung in den klinischen Ausfallerscheinungen durch IDO Inhibition im Vergleich zu den Kontrollgruppen nachgewiesen werden. Die Tage mit signifikanten Unterschieden zwischen den beiden Gruppen wurden durch Sterne gekennzeichnet. Auch an den Tagen, an denen kein signifikanter Unterschied aufgrund der hohen Varianz innerhalb einer Gruppe festgestellt wurde, lagen die Mittelwerte der klinischen Ausfallerscheinungen der mit Inhibitor behandelten Gruppen immer über denen der Kontrollgruppen.

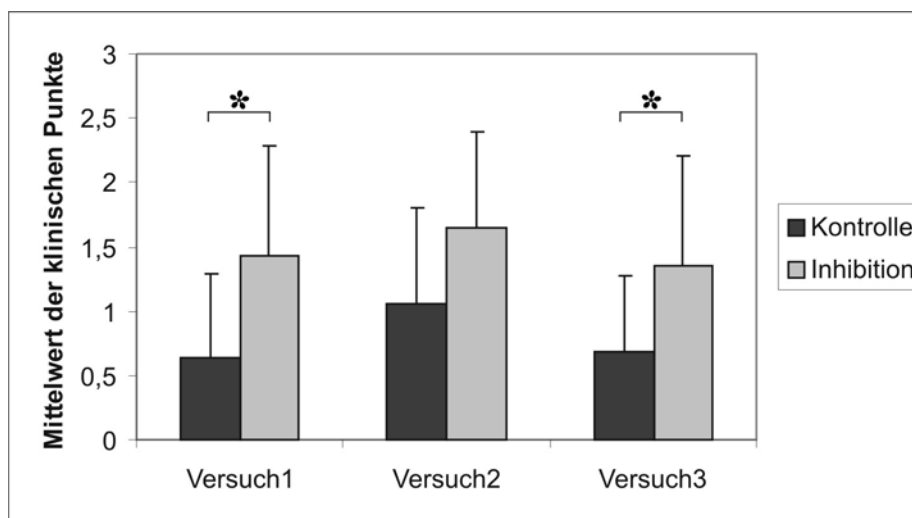


**Abbildung 16: Klinischer EAE Verlauf mit und ohne IDO Inhibitor**

Dargestellt sind die mittleren Schweregrade der klinischen Erkrankung über die Zeit für Tiere die keinen oder zusätzlich den IDO Inhibitor erhalten haben (pro Gruppe im Einzelexperiment  $N = 10$ ). Ab Beginn der Behandlung mit dem IDO Inhibitor (5 mg 1-Methyl Tryptophan pro Maus und Tag) wiesen die mit dem IDO Inhibitor behandelten Tiere (schwarze Symbole) stärkere Lähmungs-Erscheinungen auf, als die Kontrollgruppen (hellgraue Symbole). Waren die mittleren Schweregrade zwischen zwei Gruppen an einem Tag statistisch signifikant verschieden ( $p < 0,05$ ), so wurden diese durch Sterne gekennzeichnet. In allen drei Einzelexperimenten konnten während der Remissionsphasen signifikante Unterschiede zwischen Kontroll- und mit IDO Inhibitor behandelten Gruppen nachgewiesen werden.

Um den Einfluss der IDO Inhibition auf die Schwere der Erkrankung über den gesamten Krankheitsverlauf statistisch beurteilen zu können, wurde für jedes Tier der mittlere Erkrankungsgrad für den Zeitraum von Behandlungsbeginn bis zum Abschluss des Experimentes ermittelt. Die mittleren Erkrankungsgrade der einzelnen Tiere wurden dann pro Gruppe (Inhibitor gegen Trägersubstanz) wiederum als Mittelwert dargestellt (Abbildung 17). Tiere, die während der akuten Krankheitsphase verstarben (maximal 3 Tage nach Behandlungsbeginn) und Tiere, die während der gesamten Beobachtungsphase keine motorischen Ausfallserscheinungen zeigten, wurden nicht in die Berechnung eingeschlossen.

In den drei Experimenten lagen die mittleren klinischen Symptome der Kontrollgruppen deutlich unter denen der mit 1-Methyl-Tryptophan behandelten Gruppen. Mittels T-Test konnte für Versuch 1 und 3 ein signifikanter Anstieg der klinischen Symptome durch IDO Inhibition mit  $p < 0,05$  nachgewiesen werden. Auch in Versuchsgruppe 2 konnte diese Tendenz festgestellt werden ( $p = 0,055$ ).



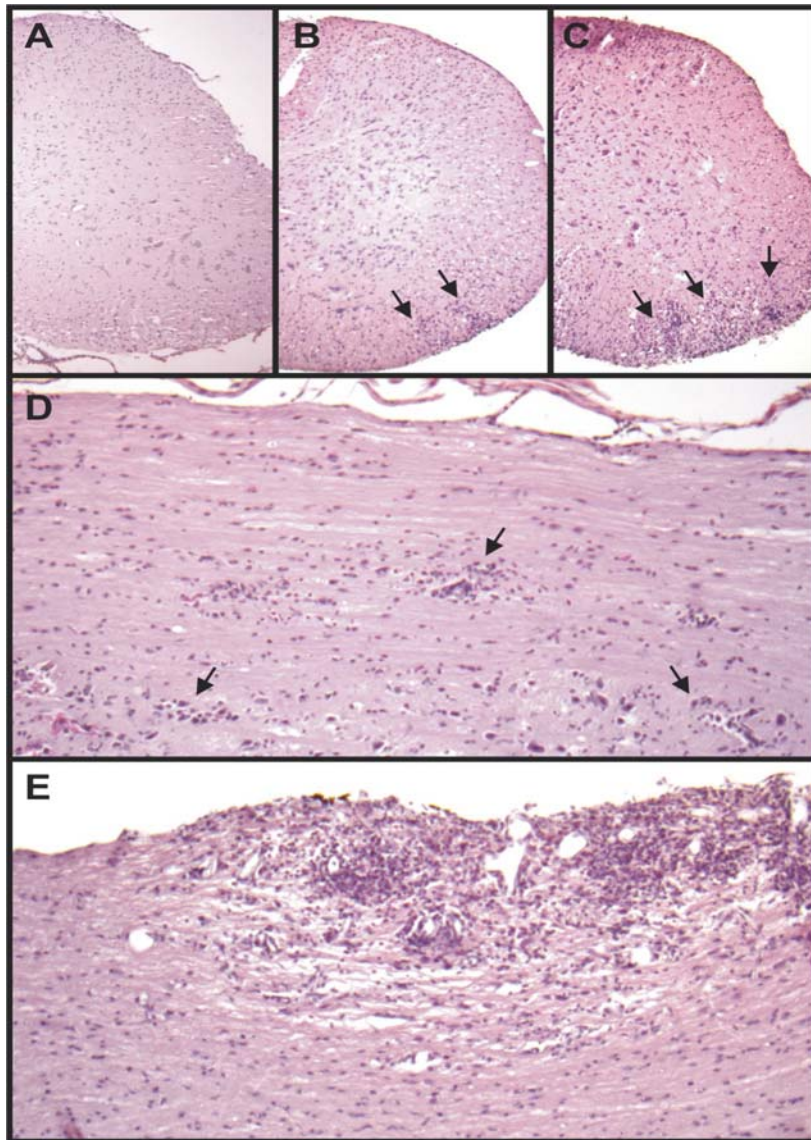
**Abbildung 17: Gemittelte klinische Schweregrade der EAE unter IDO Inhibition**

Darstellung der kumulativen Mittelwerte der drei Einzelversuche ab dem Tag nach Inhibitionsbeginn bis zum Ende der Versuchsdauer (N pro Gruppe = 10). Tiere die zu keinem Zeitpunkt klinische Symptome aufwiesen, oder während der akuten Phase (maximal 3 Tage nach Behandlungsbeginn) starben, wurden nicht in die Darstellung mit aufgenommen. In allen drei Einzelversuchen lagen die Mittelwerte der IDO inhibierten Gruppe über denen der Kontrollgruppe. Für Versuch 1 und 3 konnte die statistische Signifikanz mittels T-Test mit  $p < 0,05$  nachgewiesen werden. Im zweiten Versuchsdurchgang konnte eine Tendenz in Richtung der Hypothese festgestellt werden ( $p = 0,055$ ).

Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass eine Inhibition von IDO die klinische Symptomatik der EAE verstärkt. Diese Beobachtung unterstützt die Hypothese, dass IDO als immunregulatorisches Enzym am Krankheitsverlauf der EAE beteiligt ist.

### 4.3 Histologie der EAE und Nachweis IDO exprimierender Zellen im ZNS

Die Größe und Anzahl der während der EAE entstehenden Leukozyten Infiltrate im Rückenmark und die Stärke der zu beobachtenden Lähmungserscheinungen der Mäuse korrelieren miteinander (Sobel et al., 1990). Der histologische Nachweis dieser Entzündungen mittels HE-Färbung ist in Abbildung 18 dargestellt.



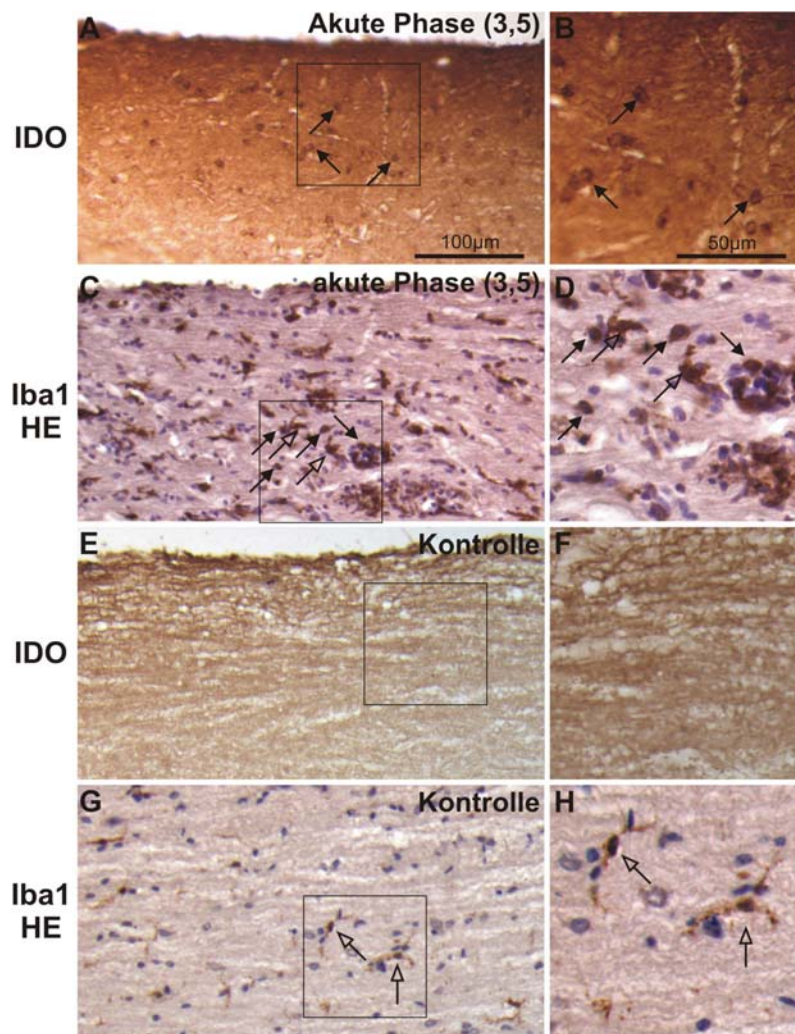
**Abbildung 18: Leukozyteninfiltrate in der akuten Phase der EAE**

Quer- (A,B,C) und Längsschnitte (D,E) durch das Rückenmark von Mäusen, die mit HE angefärbt wurden. Im unbehandelten Tier ist die Histologie des Rückenmarkes unter physiologischen Bedingungen dargestellt (A). Im Rückenmark einer Maus mit dem klinischen Schweregrad von 2,0 während der akuten EAE Phase findet man Leukozyteninfiltrate, die durch Pfeile gekennzeichnet wurden (B,D). In HE Färbungen der Rückenmarkspräparate einer Maus mit akuter EAE (klinischer Schweregrad 4,0) ist im Querschnitt (C, E) und im Längsschnitt (E) dargestellt. (Originalvergrößerungen: A,B,C: 100 fach; D,E: 200 fach)

Leukozyteninfiltrate konnten anhand der starken lokalen Häufung kleiner Zellkerne in der Umgebung von Gefäßen innerhalb der weißen Substanz des Rückenmarkes in der HE-Färbung als perivaskuläre *Cuffs* identifiziert werden. Im Querschnitt vom Rückenmark einer nicht immunisierten Maus (A) ist die Zellverteilung anhand der blau gefärbten Zellkerne dargestellt. Ein Schnitt von einer immunisierten Maus aus einer vergleichbaren Schnittebene mit leichten klinischen Symptomen (klinischer Schweregrad 2,0) zeigt zwei Infiltrate (B: Querschnitt; D: Längsschnitt), die sich deutlich durch ihre Dichte blau angefarbter Leukozytenzellkerne (Pfeile) von dem restlichen Gewebe unterscheiden. In einem Rückenmarkspräparat von einem Tier mit massiven Lähmungserscheinungen (klinischer Score 4,0) während der akuten Phase sind die massiven Infiltrate gezeigt (C: Querschnitt; E: Längsschnitt).

Für den immunzytochemischen Nachweis IDO exprimierender Zellen im ZNS während der EAE wurden Rückenmarkslängsschnitte von akut erkrankten Tieren und Kontrolltieren angefertigt. In Abbildung 19 sind repräsentative immunzytochemische Färbungen auf Rückenmarksschnitten dargestellt.

IDO positive Zellen (Pfeile) von ca. 10 µm Durchmesser konnten in der weißen Substanz des entzündeten Rückenmarks nachgewiesen werden (Abbildung 19 A, B; klinischer Schweregrad 3,5). In Folgeschnitten, die mit Iba1 gegen Makrophagen und Mikroglia zusammen mit einer HE-Färbung angefärbt wurden (Abbildung 19 C, D), konnten zum einen noch teilweise ramifizierte Mikroglia (offene Pfeile) nachgewiesen werden. Der Iba1 Antikörper markierte jedoch auch Zellen die in Größe und Morphologie mit den IDO positiven Zellen übereinstimmten (Pfeile). In Rückenmarksgewebe nicht-immunisierter Tiere (Abbildung 19 E-H, Kontrolle) konnten keine IDO positiven Zellen nachgewiesen werden (Abbildung 19 E, F). Die Doppelfärbung mit HE und Iba1 zeigte in diesem Gewebe ramifizierte ruhende Mikroglia im ZNS Parenchym (Abbildung 19 G, H, offene Pfeile).



**Abbildung 19: IDO exprimierende Zellen im Rückenmark während der EAE**

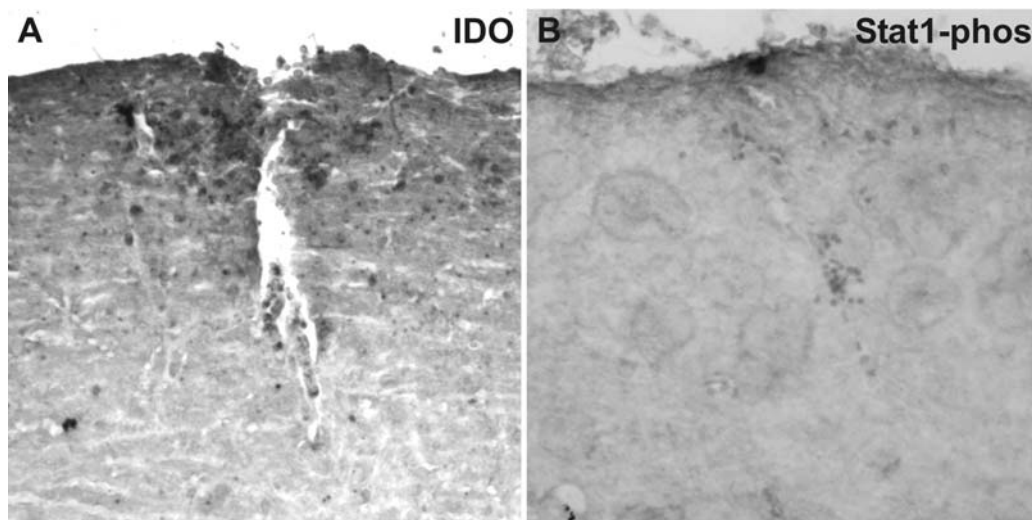
Immunzytochemischer Nachweis IDO exprimierender Zellen und Mikroglia im Rückenmarkslängsschnitt einer erkrankten Maus (EAE, klinischer Schweregrad 3,5) und einer nicht immunisierten Kontrollmaus (Kontrolle). Die mit Iba1 gefärbten Schnitte wurden mit HE gegengefärbt. Die in der linken Spalte eingezeichneten Quadrate werden in der rechten Spalte in stärkerer Vergrößerung dargestellt. (A, B) IDO exprimierende Zellen (Pfeile) Rückenmarksparenchym einer akut erkrankten Maus. (C, D) Iba1 positive Mikroglia / Makrophagen. Einige der Zellen (Pfeile) besitzen die gleiche runde Morphologie und Größe, wie die IDO exprimierenden Zellen. Es wurden auch nicht vollständig deramifizierte Mikroglia angefärbt (offene Pfeile). In dem Rückenmark von nicht immunisierten Mäusen konnten keine IDO exprimierenden Zellen nachgewiesen werden (E, F). Im Rückenmark von Kontrolltieren liegen die Mikroglia (G, H, offene Pfeile) als ramifizierte (ruhende) Zellen vor. Die Abbildungen einer Spalte wurden mit der gleichen Vergrößerung aufgenommen: links: 200 fach, rechts: 400 fach.

IDO positive Zellen konnten ausschließlich innerhalb der von der Entzündung betroffenen weißen Substanz des Rückenmarks nachgewiesen werden. Einige Iba1 positive Monozyten/Makrophagen stimmten in Größe und Morphologie mit den IDO positiven Zellen überein.



STAT1 ist der Transkriptionsfaktor, der für die Induktion der IDO Expression verantwortlich ist (Du et al., 2000). Daher ist die Phosphorylierung und Dimerbildung von STAT1 für die Expressionsinduktion der IDO notwendig (siehe Kapitel 4.5). IDO positive Zellen sollten daher positiv für phosphoryliertes STAT1 sein. Hierfür wurden Rückenmarkslängsschnitte von Mäusen während der akuten EAE Phase (klinischer Schweregrad 3,0) gegen IDO und phosphoryliertes STAT1 mittels DAB Färbung angefärbt (Abbildung 20).

In Abbildung 20 A sind IDO positive Zellen im Infiltrat dargestellt. Innerhalb der Entzündungszentren konnten ebenfalls zahlreiche für phosphoryliertes STAT1 positive Zellen identifiziert werden (Abbildung 20 B). Sowohl IDO positive Zellen, als auch Zellen mit der potentiellen Eigenschaft, das Enzym neu zu synthetisieren (positiv für phosphoryliertes STAT1), lagen innerhalb der Infiltrate vor.



**Abbildung 20: Nachweis von IDO und phosphoryliertem STAT1 in EAE-Infiltraten**

Dargestellt sind Längsschnitte des Rückenmarkes einer EAE Maus in der akuten Phase (klinischer Schweregrad 3,0). Um ein Blutgefäß (Pfeil) sind zahlreiche IDO positive Zellen (A) zu erkennen. In dem Folgeschnitt (B) konnten innerhalb des Infiltrates Zellen nachgewiesen werden, die positiv für phosphoryliertes STAT1 waren. Die Färbung erfolgte mittels Immunzytochemie und anschließender DAB Entwicklung.

## 4.4 Mikroglia und Astrozyten werden in vitro durch Zytokine stimuliert

Die Zytokine IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  und der *e.coli* Membranbestandteil LPS bewirken in kultivierten Mikroglia und Astrozyten die Produktion von NO via der induzierbaren Nitridoxyd Synthetase (iNOS) (Nakamura, 2002; Li et al., 1999). NO stellt also einen Parameter für die Aktivierung dieser beiden Zelltypen dar. Die Produktion von NO nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und LPS oder der Kombination der Stimulantien wurde deshalb hier als Parameter für die Aktivierung der Zellen verwendet. Gleichzeitig stellt das von iNOS synthetisierte NO einen IDO-Inhibitor dar (Thomas et al., 1994; Hucke et al., 2004), so konnte in diesem Versuchsaufbau zum einen die Wirksamkeit der verwendeten Stimuli mittels Western-Blot untersucht werden, und zum anderen die in vitro Synthese eines IDO Inhibitors mittels kalorimetrischem Nitritnachweis.

Um in vitro die Aktivierung primärer Astrozyten und Mikroglia nachzuweisen, wurde sowohl die NO Freisetzung in den Kulturmedien biochemisch gemessen, als auch der Proteinnachweis der iNOS in Zellysaten mittels Western-Blot analysiert. Je drei unabhängig voneinander präparierte Zellkulturen wurden mit den in Tabelle 11 angegebenen Substanzen für 24 Stunden inkubiert. Als Negativkontrollen wurden Medien und Zellen nicht stimulierter Kulturen verwendet. Im Folgenden werden bei der kombinierten Gabe von zwei Substanzen die in der Tabelle 11 links aufgeführten Abkürzungen verwendet.

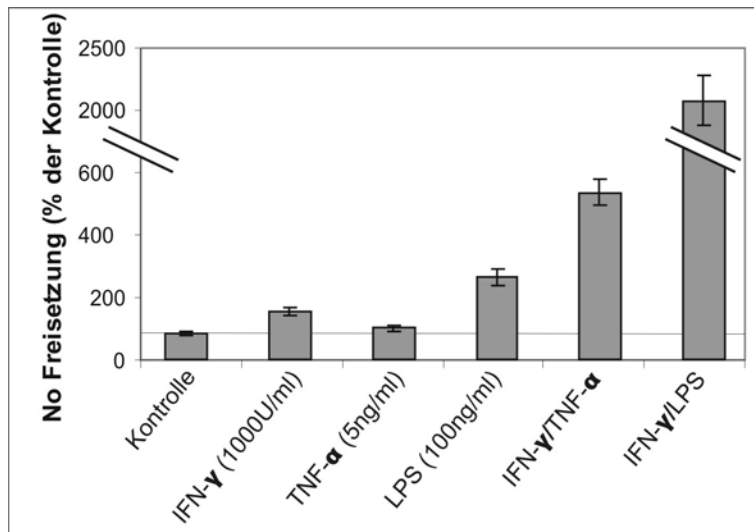
**Tabelle 11: In der Zellkultur verwendete Stimulation**

Für die in vitro Stimulation primärer Zellkulturen verwendeter Substanzen und Konzentrationen sowie deren Kombination.

	IFN- $\gamma$	TNF- $\alpha$	LPS
Kontrolle	-	-	-
IFN- $\gamma$	1000 Units / ml	-	-
TNF- $\alpha$	-	5ng / ml	-
LPS	-	-	100 ng / ml
IFN- $\gamma$ / TNF- $\alpha$	1000 Units / ml	5ng / ml	-
IFN- $\gamma$ / LPS	1000 Units / ml	-	100 ng / ml

Zur besseren Darstellung wurden die NO-Werte, die in den Überständen von unstimulierten Kulturen gemessen wurden, auf 100 % gesetzt. Die nach Stimulation erhaltenen NO-Werte wurden prozentual zur Kontrolle dargestellt. 24 Stunden nach Inkubation mit TNF- $\alpha$  konnte keine Erhöhung der NO Produktion in Mikroglia festgestellt werden (Abbildung 21). IFN- $\gamma$  bewirkte eine Verdoppelung ( $185 \% \pm 14 \%$ ) des produzierten NO im Vergleich zur Kontrolle. LPS führte zur dreifachen ( $316 \% \pm 30 \%$ ) Erhöhung der NO Konzentration im Vergleich zur Kontrolle (Abbildung 21). Die gleichzeitige Gabe von IFN- $\gamma$  zusammen mit TNF- $\alpha$  oder LPS führte zu einer synergistischen Steigerung der Nitritakkumulation in dem Kulturmedium. So steigerte die Stimulation von

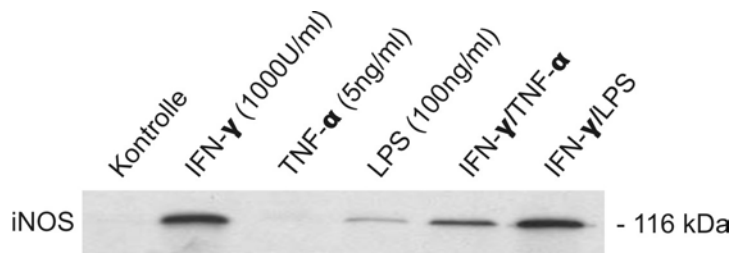
Mikroglia mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  die Nitritkonzentration um 480 % ( $\pm$  50 %) und bei der Verwendung von IFN- $\gamma$  und LPS um 1866% ( $\pm$  98 %).



**Abbildung 21: NO Freisetzung in primären Mikroglia kulturen**

Darstellung der relativen NO Akkumulation in Kulturüberständen primärer Mikroglia nach 24-stündiger Kultivierung. Der in den unstimulierten Kontrollen ermittelte Wert wurde als 100% definiert. Mit IFN- $\gamma$  oder LPS stimulierte Mikroglia zeigten eine Steigerung der NO Produktion. Dieser Effekt konnte in den mit TNF- $\alpha$  inkubierten Kulturen nicht nachgewiesen werden. Die Kombination von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  oder LPS wirkte synergistisch auf die NO Synthese im Vergleich zur Einzelsubstanzstimulation. Die dargestellten Werten stellen die Mittelwerte  $\pm$ SEM von drei unabhängigen Experimenten dar.

In unstimulierten Kontrollkulturen konnte keine iNOS nachgewiesen werden. Sowohl IFN- $\gamma$  als auch LPS induzierten die Expression von iNOS Protein in den Kulturen (Abbildung 22), während TNF- $\alpha$  alleine keinen Einfluss auf die Expression der iNOS hatte. Erfolgte die Stimulation der Mikroglia mit IFN- $\gamma$  in Kombination mit TNF- $\alpha$  oder LPS so konnte ebenfalls iNOS in diesen Kulturen nachgewiesen werden.



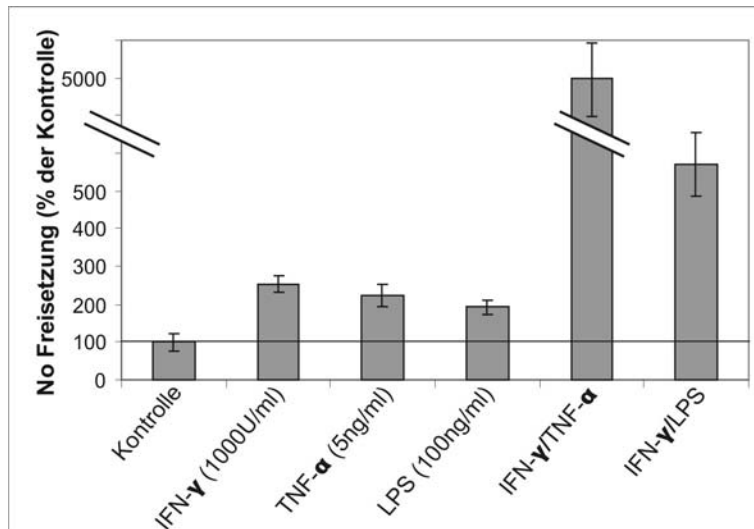
**Abbildung 22: Nachweis von iNOS im Proteinlysat primärer Mikroglia**

Western-Blot für iNOS aus Proteinlysaten unstimulierter und stimulierter Mikroglia kulturen nach 24-stündiger Inkubation mit den in der Abbildung angegebenen Substanzen und Konzentrationen. In Kontrollkulturen und TNF- $\alpha$  stimulierter Mikroglia war kein iNOS Signal nachzuweisen. IFN- $\gamma$  induzierte deutlich die iNOS Synthese, wohingegen LPS und IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  zusammen schwächere iNOS Banden induzierten. In Kulturen, die mit IFN- $\gamma$  und LPS zusammen stimuliert wurden, war das Signal am stärksten. Es wurden je Spur 20  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen, dargestellt ist ein repräsentativer Western-Blot.

Die verwendeten Stimuli führten in den primären Mikroglia zur Expression von enzymatisch aktivem iNOS Protein, was zur gesteigerten Akkumulation von NO in den Medien führte (Abbildung 21 und 22)

Analog zu den oben beschriebenen Experimenten wurden Proteinproben von Astrozyten und die dazugehörigen Kulturüberstände nach 24-stündiger Stimulation (siehe Tabelle 11) auf die Expression von iNOS und der Akkumulation von Nitrit untersucht. Astrozyten konnten ebenfalls, wie Mikroglia, durch Inkubation mit Zytokinen zur funktionellen Expression von iNOS stimuliert werden (Abbildung 23 und 24).

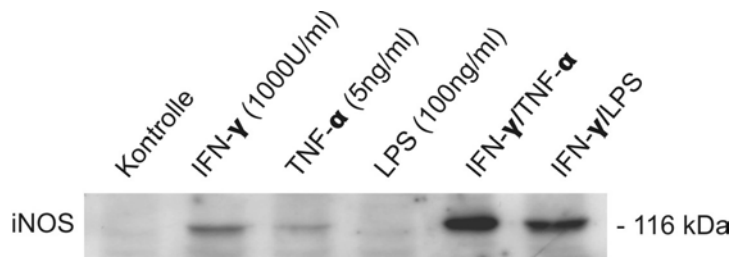
In Mikroglia kulturen führte die Stimulation mit IFN- $\gamma$  beinahe zu einer Verdreifachung ( $284\% \pm 22\%$ ) der Nitritakkumulation in den Kulturüberständen. In den Medien TNF- $\alpha$ - oder LPS-stimulierter Astrozyten lag die Nitrit Konzentration um  $232\% (\pm 29\%)$  bzw.  $201\% (\pm 21\%)$  höher als in den Kontrollen (Abbildung 23). Wie bereits für Mikroglia beschrieben, führte die Inkubation von Astrozyten mit IFN- $\gamma$  in Kombination mit TNF- $\alpha$  oder LPS zur synergistisch gesteigerten Nitritsynthese um  $4983\% (\pm 120\%; \text{TNF-}\alpha)$  und  $571\% (\pm 85\%; \text{LPS})$ .



**Abbildung 23: NO Freisetzung in primären Mikroglia kulturen**

Durch 24-stündige Stimulation mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und LPS wurde die Freisetzung von NO in den Zellkulturen stark gesteigert. Wurden die Zellen mit IFN- $\gamma$  in Kombination mit TNF- $\alpha$  oder LPS stimuliert, so war die nachgewiesene Nitrit-Akkumulation in den Kulturenmedien deutlich größer als bei Einzelsubstanzstimulation. Die dargestellten Werte stellen die Mittelwerte  $\pm$ SEM von drei unabhängigen Experimenten dar. Die in den Kontrollüberständen ermittelte NO Konzentration wurde auf 100% normiert und alle Werte auf diese bezogen.

In den Proteinlysaten unstimulierter Astrozyten Kulturen konnte kein iNOS Signal nachgewiesen werden. IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induzierten die Neusynthese von iNOS Protein. In LPS stimulierten Zellen konnte nur ein schwaches iNOS Signal im Western-Blot detektiert werden (Abbildung 24). Die simultane Stimulation von Astrozyten mit IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ /LPS führte zu der stärksten Expression von iNOS.



**Abbildung 24: Nachweis von iNOS im Proteinlysate primärer Astrozyten**

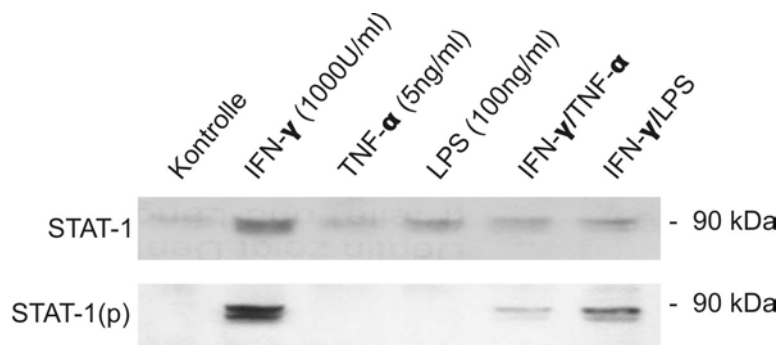
Western-Blot für iNOS aus Proteinlysaten stimulierter Astrozytenkulturen nach 24 stündiger Inkubation. In Kontrollkulturen war kein iNOS Signal nachzuweisen. IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  induzierten die iNOS Synthese. Die stärkste iNOS Expression konnte in Kulturen nachgewiesen werden, die entweder mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  oder mit IFN- $\gamma$  und LPS zusammen stimuliert wurden. LPS alleine hatte hingegen keine nachweisbare Auswirkung auf die Expression des Enzyms. Es wurden je Spur 20  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen. Die Abbildung zeigt einen repräsentativen Western-Blot.

Sowohl primäre Astrozyten als auch Mikroglia konnten durch die verwendeten Signale aktiviert werden. Während Astrozyten durch TNF- $\alpha$  zur Expression von iNOS stimuliert wurden, konnte dieser Effekt in Mikroglia weder auf Proteinebene noch in Form der NO Akkumulation beobachtet werden. Die größte Steigerung der iNOS Expression und Aktivität konnte in Mikroglia mit der Kombination von IFN- $\gamma$  und LPS erzielt werden. In Astrozyten hingegen führte die gleichzeitige Stimulation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  zur stärksten iNOS Expression und Aktivität. IFN- $\gamma$  alleine induzierte in beiden Zelltypen die funktionelle Expression von iNOS.

#### **4.5 Der Transkriptionsfaktor STAT1 wird in aktivierten Mikroglia und Astrozyten phosphoryliert**

In Proteinlysaten aus stimulierten primären Astrozyten- und Mikroglia kulturen wurde untersucht, ob die Aktivierung der Zellen mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  und LPS nach 24 Stunden Einfluss auf die Phosphorylierung des für die Expression der IDO essentiellen Transkriptionsfaktors STAT1 hat. Die Zellen wurden 24 Stunden mit den in Tabelle 11 aufgeführten Substanzen stimuliert und mittels Western-Blot und spezifischen Antikörpern gegen phosphoryliertes (aktiviertes) und nicht phosphoryliertes (nicht aktiviertes) STAT1 untersucht.

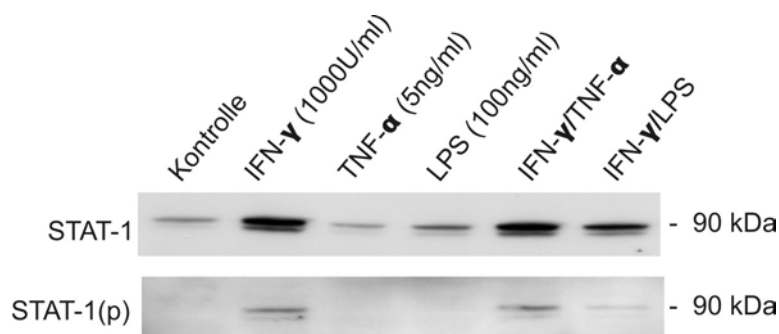
In unstimulierten Mikroglia kulturen konnte phosphoryliertes STAT1 nicht nachgewiesen werden (Abbildung 37). Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  führte in Mikroglia zur Phosphorylierung von STAT1 (Abbildung 25, STAT-1(p)) und zur Neusynthese von nicht phosphoryliertem STAT1 (Abbildung 25, STAT-1). TNF- $\alpha$  und LPS alleine bewirkten keine nachweisbare Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors, obwohl beide Stimuli zur verstärkten Neusynthese von nicht phosphoryliertem STAT1 führten. Nach Aktivierung der Mikroglia mit IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ /LPS konnte phosphoryliertes STAT1 nachgewiesen werden. Trotz gleicher IFN- $\gamma$  Konzentration in diesen Kulturen, war das Signal für phosphoryliertes STAT1 geringer als in den nur mit IFN- $\gamma$  stimulierten Kulturen. Die durch IFN- $\gamma$  induzierte, für die Expression der IDO essentielle, Phosphorylierung von STAT1 (Du et al., 2000; Sotero et al., 2000) konnte in den primären Mikroglia Kulturen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ , IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ /LPS nachgewiesen werden.



**Abbildung 25: Nachweis von phosphoryliertem und nicht phosphoryliertem STAT1 im Proteinlysate primärer Mikroglia**

Repräsentativer Western-Blot aus Proteinlysaten von Mikroglia nach 24 stündiger Kultivierung. Die Kulturen wurden entweder nicht stimuliert (Kontrolle) oder 24 Stunden mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ /LPS behandelt. Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  induzierte die Phosphorylierung von STAT1 in primärer Mikroglia. Die anderen Aktivierungsbedingungen bewirkten dies nicht. Die Phosphorylierung von STAT1 erfolgte ausschließlich in Kulturen, in denen IFN- $\gamma$  alleine oder in Kombination zur Stimulation verwendet wurden, wobei das stärkste Signal für phosphoryliertes STAT1 in den mit IFN- $\gamma$  alleine stimulierten Zellkulturen nachweisbar war. Es wurden je Spur 20  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen.

Eine Inkubation über 24 Stunden mit IFN- $\gamma$  induzierte in primären Mikroglia kulturen die Neusynthese und Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT-1. In Astrozytenkulturen, die mit IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$ /LPS stimuliert wurden, konnte ebenfalls eine Neusynthese und die Phosphorylierung von STAT1 nachgewiesen werden. Hingegen induzierten TNF- $\alpha$  oder LPS alleine weder die Neusynthese von STAT-1, noch die phosphorylierungsbedingte Aktivierung des Transkriptionsfaktors. In Astrozyten bewirkt IFN- $\gamma$  die für die Expression der IDO notwendige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT-1.



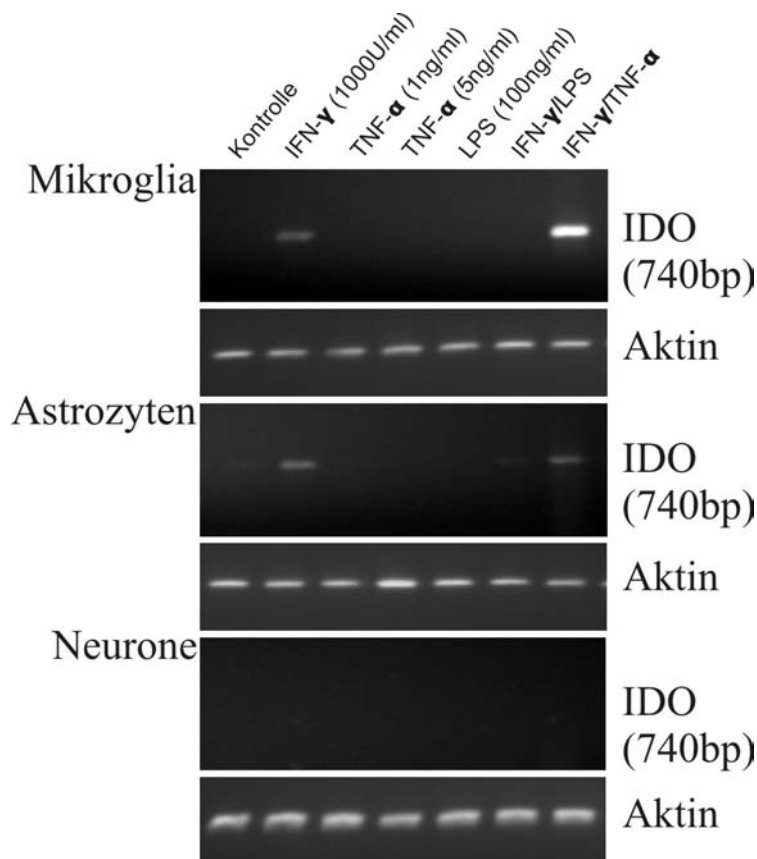
**Abbildung 26: Nachweis von phosphoryliertem STAT1 im Proteinlysate primärer Astrozyten**

Die 24-stündige Stimulation mit IFN- $\gamma$  bewirkte die Phosphorylierung von STAT1 in primären Astrozyten. Unter den anderen Aktivierungsbedingungen konnte dies nicht beobachtet werden. Die Phosphorylierung von STAT1 erfolgte ausschließlich in Kulturen in denen IFN- $\gamma$  alleine oder in Kombination zur Stimulation verwendet wurden. Das stärkste Signal für phosphoryliertes STAT1 lag in den IFN- $\gamma$  stimulierten Zellkulturen vor. Es wurden je Spur 20  $\mu$ g Gesamtprotein aufgetragen. Das dargestellte Ergebnis stellt eins von drei unabhängig durchgeführten Experimenten dar.

Sowohl in Mikroglia, als auch in Astrozyten, wurde der Transkriptionsfaktor STAT1 durch die Stimulation mit IFN- $\gamma$  phosphoryliert/aktiviert.

#### 4.6 Interferon- $\gamma$ induziert die Bildung von IDO mRNA in primären Mikroglia und Astrozyten Kulturen

In diesem Abschnitt sollte überprüft werden, ob ZNS-Parenchym spezifische Zellen wie Neurone, Astrozyten und Mikroglia in der Lage sind, IDO-mRNA zu bilden. Hierzu wurden primäre Zellkulturen von Mikroglia, Astrozyten und Neuronen wie in Kap. 2.1 beschrieben präpariert und anschließend in 6 Well-Platten kultiviert. Es folgte eine 24-stündige Stimulation mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, IFN- $\gamma$ /LPS oder IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ . Die anschließend isolierten mRNAs wurden mit RT-PCR auf IDO mRNA untersucht. Als Kontrolle wurden  $\beta$ -Aktin PCRs mit den zugehörigen cDNA Proben durchgeführt.



**Abbildung 27: Expression von IDO mRNA in primären Mikroglia, Astrozyten und Neuronen**

Dargestellt sind die IDO und  $\beta$ -Aktin mRNA in Mikroglia, Astrozyten und Neuronen nach 24-stündiger Stimulation mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, IFN- $\gamma$ /LPS oder IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$ . Die Kontrollkulturen blieben unstimuliert. Unter den IDO PCR Produkten sind die jeweiligen PCR Produkte für das Haushaltsgen  $\beta$ -Aktin dargestellt. In Astrozyten- und Mikroglia kulturen, die mit IFN- $\gamma$  oder IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  stimuliert wurden, konnte IDO mRNA nachgewiesen werden. Stimulation von Mikroglia mit IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  führte zu einem stärkeren IDO mRNA Signal. Unter keiner der untersuchten Bedingungen konnte IDO mRNA in primären Neuronen nachgewiesen werden.



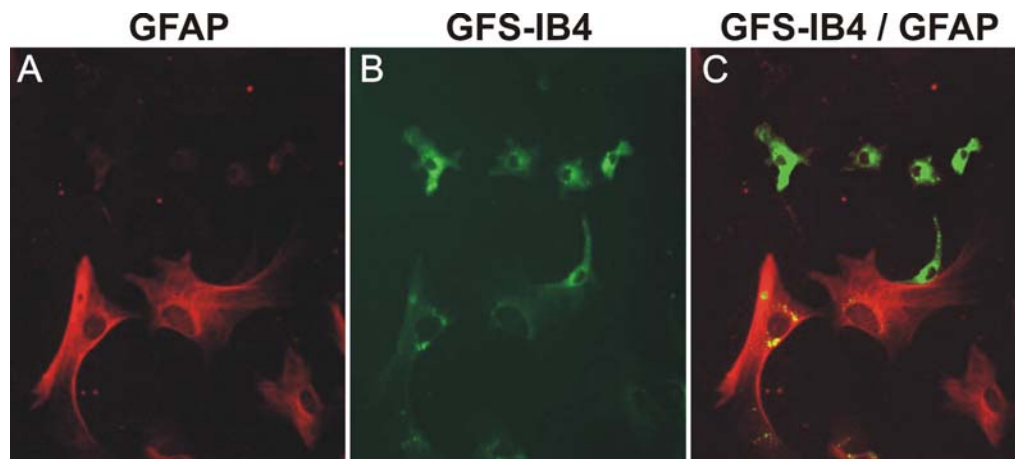
Unstimulierte Mikroglia und Astrozyten exprimieren keine nachweisbaren Mengen an IDO mRNA (Abbildung 27). Wurden die Zellen mit IFN- $\gamma$  oder mit IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  stimuliert, war ein IDO PCR Produkt mit der für die verwendeten Primer zu erwartenden Größe von 740 Basenpaaren, nachweisbar (Abbildung 27). In Fibroblasten und Makrophagen (Carlin et al., 1989; Currier et al., 2000; Robinson et al., 2003) führte eine gleichzeitige Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder LPS mit IFN- $\gamma$  zu einer Verstärkung der Expression der IDO. Dieser Effekt konnte in Mikroglia kulturen, nicht jedoch in Astrozyten kulturen beobachtet werden. Die Sequenzierung der PCR Produkte belegte, dass es sich bei den PCR-Produkten um IDO mRNA handelte. In Neuronen führte keine der untersuchten Stimulationen zur Expression von IDO mRNA (Abbildung 27).

Es konnte gezeigt werden, dass unstimulierte Mikroglia oder Astrozyten kein IDO exprimieren. Nach Stimulation mit IFN $\gamma$  konnte in Mikroglia und Astrozyten in vitro IDO mRNA nachgewiesen werden. Daraus folgt, dass die Expression der IDO abhängig vom Aktivierungsgrad in Mikroglia und Astrozyten erfolgt. Die kombinierte Gabe von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  wirkte synergistisch auf die Transkription der IDO in Mikroglia. In primären Neuronenkulturen konnte durch keine der verwendeten Stimulationsbedingungen die Expression von IDO mRNA nachgewiesen werden.

## **4.7 Immunzytologischer Nachweis von IDO in primären Zellkulturen**

Da der Nachweis von mRNA nicht das Vorhandensein des zugehörigen Proteins belegt, wurde die Expression der IDO auf Proteinebene mittels indirekter Immunfluoreszenz in Zellkultur untersucht. Für den Nachweis der IDO wurde polyklonales IDO-Antiserum verwendet. Die Differenzierung zwischen Mikroglia und Astrozyten erfolgte durch die spezifische Markierung des entsprechenden Zelltyps. Astrozyten wurden mit GFAP-Antikörpern und Mikroglia mit dem Isolektin GFS-B4 markiert. In Abbildung 28 ist dies als Beispiel an einer Mischkultur dargestellt. Diese Doppelmarkierung diente in Einzelkulturen von Mikroglia oder Astrozyten zur Überprüfung der Reinheit der Zellkulturen. Sowohl Astrozyten- als auch Mikroglia kulturen wiesen eine Reinheit von mehr als 95% auf. In den zuvor durchgeführten mRNA Experimenten konnte in primären Neuronenkulturen kein IDO Transkript nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.6). Auf Proteinebene ergab die immunzytochemische Untersuchung an Neuronen ebenfalls keinen Hinweis auf das Vorhandensein von IDO (nicht dargestellt).

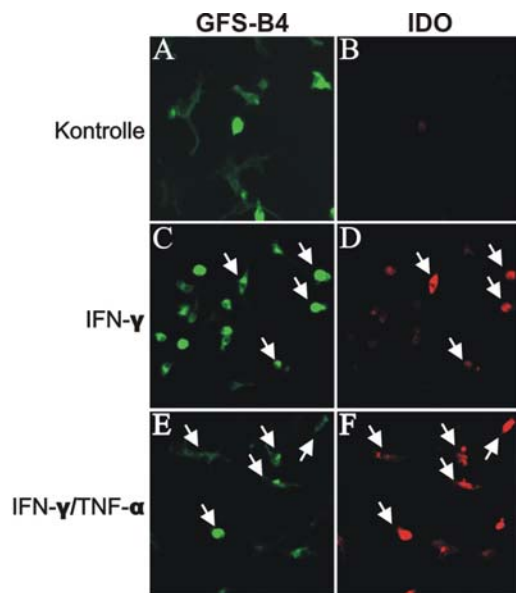
In der Doppelfluoreszenzmarkierung einer Astrozyten-Mikroglia Mischkultur mit den spezifischen Markern GFAP und GFS-IB4 (Abbildung 28) ist die unterschiedliche Morphologie von Astrozyten (rot) und Mikroglia (grün) deutlich. Während Astrozyten als große (Durchmesser bis 40  $\mu$ m) flächige Zellen in der Zellkultur vorliegen, weisen die wesentlich kleineren Mikroglia einige wenige Ausläufer auf, was auch als amöboide Morphologie bezeichnet wird.



**Abbildung 28: GFAP und GFS-B4 Doppelfluoreszenz-Färbung in einer primären Mikroglia/Astrozyten Mischkultur**

Doppelfluoreszenz-Färbung einer aus Astrozyten (A, rot) und Mikroglia (B, grün) bestehenden Mischkultur 24 Stunden nach Inkubation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Astrozyten (A) weisen ihre für die Zellkultur typische flächige Zellform auf. Mikroglia (B) besitzen wenige Ausläufer und sind deutlich kleiner als Astrozyten. Die Überlagerung der beiden Einzelbilder zeigt, dass unterschiedliche Zelltypen angefärbt wurden.

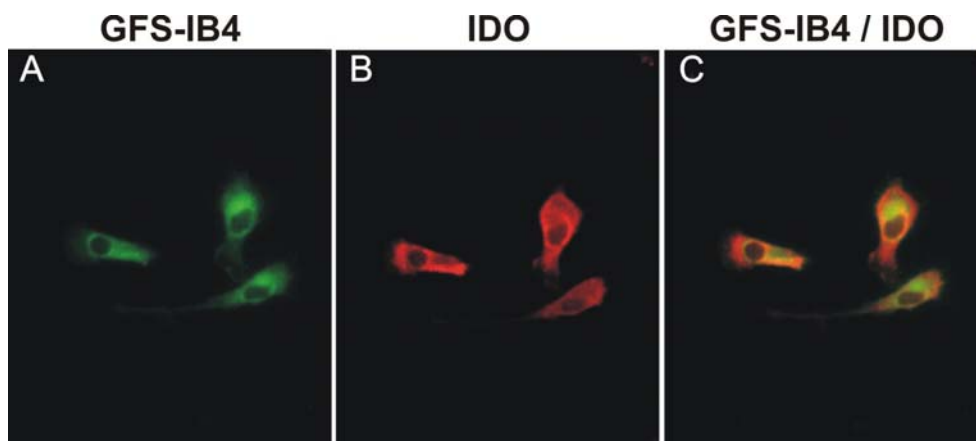
Kulturen, die aus 95 % Mikroglia bestehen, wurden mit IFN- $\gamma$ , oder IFN- $\gamma$  / TNF- $\alpha$  für 24 Stunden stimuliert. Diese beiden Stimulationen wurden gewählt, da beide auf der Ebene der mRNA die Induktion der IDO bewirkten (siehe Kapitel 4.6). GFS-B4 reaktive Mikroglia wurden grün-fluoreszierend (Abbildung 29 A, C und E) und IDO Protein rot angefärbt (Abbildung 29 B, D und F). Doppelt positive Zellen wurden durch Pfeile gekennzeichnet. Unstimulierte Mikroglia (Abbildung 29 A) zeigten kein nachweisbares IDO Signal (Abbildung 29 B). Nach 24 Stunden Stimulation mit IFN- $\gamma$  waren ein großer Teil der Mikroglia (Abbildung 29 C) ebenfalls positiv für IDO (Abbildung 29 D). Der Anteil IDO exprimierender Zellen in der Mikroglia kultur und die Signalintensität konnte durch die gekoppelte Stimulation mit IFN- $\gamma$ , und TNF- $\alpha$  deutlich erhöht werden.



**Abbildung 29: Fluoreszenzaufnahmen von stimulierten primären Mikroglia**

Mikroglia wurden mit GFS-B4 (grün) markiert und IDO Expression mittels roter Fluoreszenz nachgewiesen. Doppelt positive Zellen sind durch Pfeile gekennzeichnet. Unter Kontrollbedingung (A,B) konnte keine IDO Expression nachgewiesen werden. Nach 24 stündiger Stimulation mit IFN- $\gamma$  (C,D) reagierten die Mikroglia verstärkt gegen das Antiserum. Dieser Effekt konnte durch die gleichzeitige Inkubation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  auf nahezu 100 % der Zellen gesteigert werden (D,E).

Die Überlagerung des GFS-IB4 (grün) und des IDO Signals (rot) ergeben eine gelbe Fluoreszenz. Durch diese Überlagerung ist es möglich, doppelpositive Zellen zu identifizieren. In Abbildung 30 ist dies für IFN $\gamma$ /TNF- $\alpha$  stimulierte Mikroglia dargestellt. Sie zeigt deutlich, dass Mikroglia IDO exprimiert (Abbildung 30).

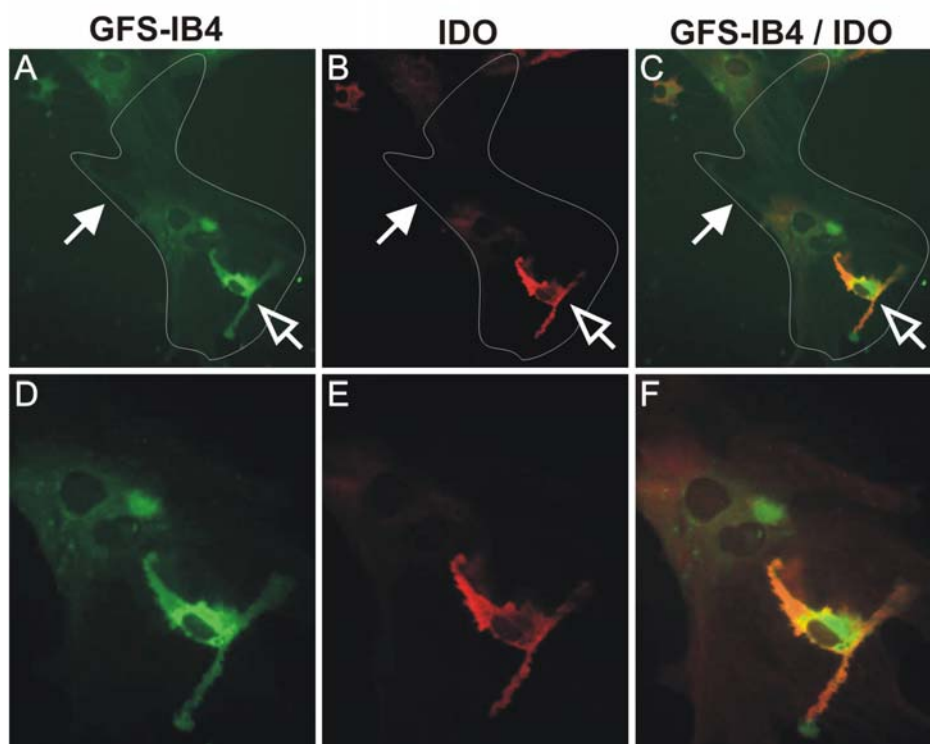


**Abbildung 30: IDO positive Mikroglia**

Immunfluoreszenz von GFS-IB4 positiver Mikroglia (A) und dem IDO Signal (B), nach 24 Stunden Inkubation mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$ . Durch Überlagerung der beiden Fluoreszenzbilder konnte gezeigt werden, dass Mikroglia IDO exprimieren.

Übereinstimmend mit den RT-PCR Daten (siehe Kapitel 4.6) konnte gezeigt werden, dass Mikroglia in vitro unter proinflammatorischen Bedingungen IDO exprimieren. Der induzierende Schlüsselstimulus war IFN- $\gamma$ , da nur mit diesem Zytokin die Expression von IDO in Mikroglia ausgelöst werden konnte. TNF- $\alpha$  alleine hatte keinen Einfluss auf die IDO-Expression. In Kombination mit IFN- $\gamma$  konnte TNF- $\alpha$  jedoch die Enzymexpression verstärken.

In den primären Astrozytenkulturen konnten keine IDO positive Astrozyten gefunden werden (Abbildung 31 B). Alle IDO-positiven Zellen konnten durch die Doppelfärbung als Mikroglia identifiziert werden. Ein Beispiel ist in Abbildung 31 dargestellt. Ein Astrozyt wurde zur Verdeutlichung weiß umrandet. Die in den Astrozytenkulturen gefundenen IDO (Abbildung 31 B, C) exprimierenden Zellen stellten Mikroglia dar (Abbildung 31 A, grün).



**Abbildung 31: Identifikation IDO exprimierender Zellen in Astrozytenkultur**

GFS-IB4/IDO Doppelfluoreszenzfärbung einer primären Astrozytenkultur, die 24 Stunden mit IFN- $\gamma$ /TNF- $\alpha$  stimuliert wurde. IDO positive Zellen (B,E) sind ebenfalls GFS-IB4 positiv (A,D) und stellen somit Mikroglia dar. Astrozyten (weiße Umrandung in A-C) sind nicht IDO positiv, was durch die Überlagerung der Bilder C und E bestätigt werden konnte.

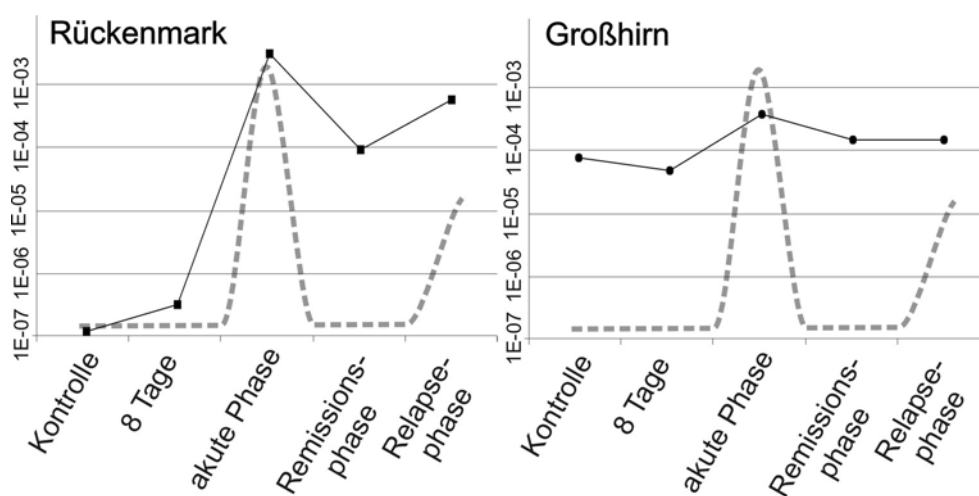
Das in der RT-PCR nachgewiesene IDO Transkript in Astrozytenkulturen könnte auf die Mikrogliaverunreinigung in den Astrozytenkulturen zurückzuführen sein. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass Mikroglia nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  IDO in vitro exprimieren, Astrozyten dazu jedoch nicht in der Lage sind.

## 4.8 Quantitative RT-PCRs von an der EAE beteiligten Schlüssel Proteinen

Die für die Regulation der IDO wichtigen Faktoren mittels semiquantitativer RT-PCR in der EAE untersucht. Die untersuchten Stimuli waren die Zytokine IFN- $\gamma$  und IL-10 und die IDO unterdrückende iNOS (Hucke et al., 2004).

### 4.8.1 IFN- $\gamma$ mRNA Synthese während der EAE

Der Expressionsverlauf des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$  wurde während des Krankheitsverlaufes der EAE im ZNS untersucht (siehe Kapitel 4.8).



**Abbildung 32: IFN- $\gamma$  mRNA Expression im Großhirn, Rückenmark und der Milz im Verlauf der EAE Erkrankung**

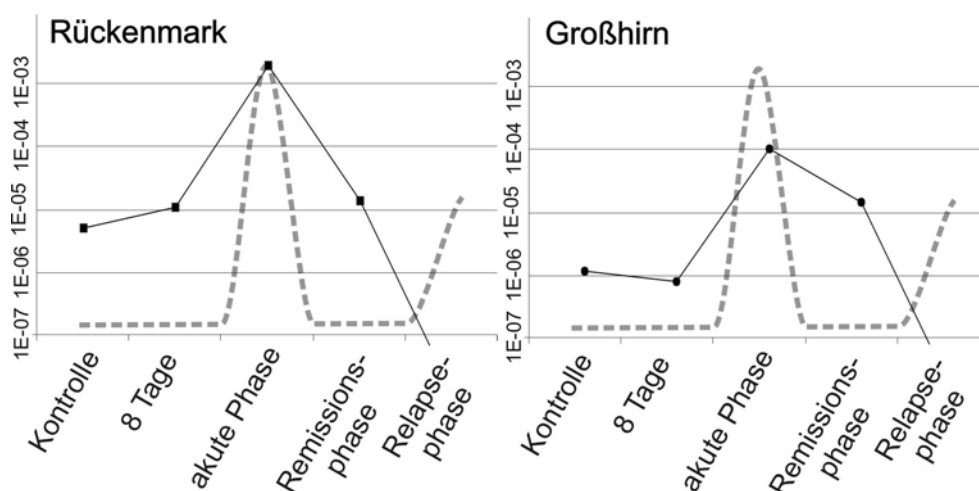
Es wurden die relativen Mengen (IFN- $\gamma$  gegen GAPDH) an IFN- $\gamma$  mRNA während der EAE logarithmisch aufgetragen gegen die klinischen Phasen der EAE. Der auffälligste Effekt konnte im Rückenmark nachgewiesen werden. Hier stieg die IFN- $\gamma$  Transkription während der akuten Phase stark und nach einem leichten Rückgang während der Remissionsphase erneut wieder an. Im Großhirn erreichte die IFN- $\gamma$  mRNA Transkription ihr Maximum in der akuten klinischen Phase und ging während der Remissions- und Relapsephase wieder auf den Wert der nichtimmunisierten Kontrolltiere zurück.

Im Großhirn konnte während der akuten Phase ein Anstieg von IFN- $\gamma$  mRNA festgestellt werden. In der Remissionsphase gingen diese Werte wieder auf das Niveau der Kontrollen zurück. Im Rückenmark lag 8 Tage nach Immunisierung ein Anstieg an IFN- $\gamma$  mRNA vor. Die größte Steigerung konnte in der akuten Phase während der massiven Entzündung im Rückenmark gefunden werden, wobei die IFN- $\gamma$  mRNA Menge auch während der Remissions- und Relapsephase stark erhöht blieb.

### 4.8.2 iNOS mRNA Synthese während der EAE

In Astrozyten und Mikroglia wird iNOS durch IFN- $\gamma$  induziert (siehe Kapitel 4.4). Da Nitrit die Aktivität von IDO unterdrückt (Hucke et al., 2004), wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression von iNOS während der EAE mittels semiquantitativer *real time* PCR (siehe Kapitel 4.8) untersucht.

In Rückenmark und Großhirn (Abbildung 33), die von der Entzündung direkt betroffen sind, stieg die Expression von iNOS mRNA in der akuten Phase massiv an. In der chronischen Relapsephase war in keinem der beiden Gewebe iNOS Transkript nachzuweisen. Die Induktion der iNOS Transkription erfolgte analog mit der in Kapitel 4.8.1 beschriebenen Steigerung von IFN- $\gamma$  mRNA innerhalb des ZNS.



**Abbildung 33: iNOS mRNA Expression im Rückenmark und Großhirn während der EAE**

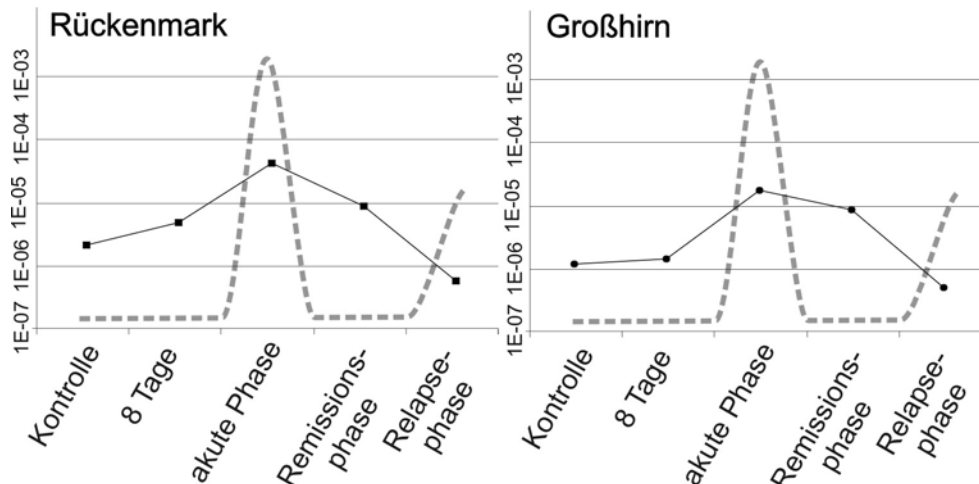
Dargestellt sind die logarithmisch aufgetragenen relativen Mengen (iNOS gegen GAPDH) an iNOS mRNA der EAE. Die X-Achse stellt den zeitlichen Verlauf der EAE dar, wobei die Zeitpunkte der Organentnahme angegeben sind. Im ZNS stieg sowohl im Rückenmark als auch im Großhirn die Menge an iNOS mRNA massiv an, ging während der Remissionsphase zurück und lag in der chronischen Relapsephase unterhalb der Nachweisgrenze.

### 4.8.3 IL-10 mRNA Synthese während der EAE

IL-10 ist ein antiinflammatorisches Zytokin, das in der MOG-EAE (C57BL/6J Mäuse) von B-Zellen produziert wird, und für das Eintreten der Remissionsphase essentiell notwendig ist (Fillatreu et al., 2002). Reife CD 123<sup>+</sup> dendritische Zellen exprimieren *in vitro* unter Stimulation von IL-10 und CD40L funktionell IDO, auch in Abwesenheit von IFN- $\gamma$  (Munn et al., 2002). Da auch während der PLP-EAE in SJL Mäusen dendritische Zellen als Folge der Entzündung im Rückenmark vorliegen (Serafini et al., 2002), wurde die Expression dieses Zytokins auf mRNA Ebene im ZNS und in der Milz untersucht.

Im Rückenmark und Großhirn stieg die Synthese von IL-10 mRNA in der akuten klinischen Phase stark an und ging während der Remissionsphase wieder leicht zurück. In der Relapsephase, in der wie in der akuten Phase die

Tiere deutliche klinische Ausfallerscheinungen aufwiesen, fand jedoch keine gesteigerte IL-10 mRNA Synthese statt. Die dargestellten Daten zeigen, dass ein Anstieg der IL-10 Expression mit der Reduktion der klinischen Befunde (akute Phase, Score 3-4 zu Remissionsphase, Score 0) einherging.



**Abbildung 34: IL-10 mRNA Expression im Rückenmark und Großhirn während der EAE**

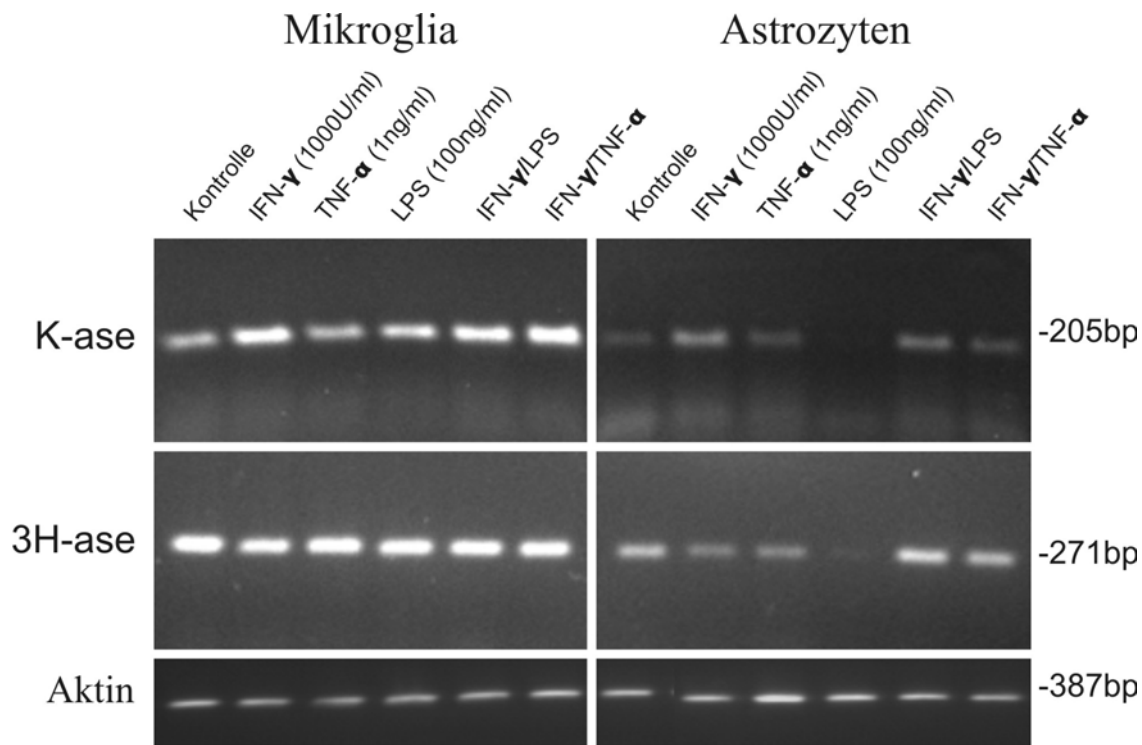
Relative Mengen IL-10 mRNA (IL-10 gegen GAPDH) während der EAE, logarithmisch dargestellt. Der zeitliche Verlauf der EAE ist auf der X-Achse angegeben, wobei die Zeitpunkte der Organentnahme angegeben sind. Sowohl im Rückenmark als auch im Großhirn war die Menge an IL-10 mRNA wesentlich höher, als in den Kontrollen oder den Proben, die 8 Tage nach Immunisierung gewonnen wurden. Zum Zeitpunkt der Remission lagen die IL-10 Werte unter denen der akuten Phase, und sanken schließlich deutlich unter die Kontrollwerte.

#### 4.9 Expression von Kynurinase und 3-Hydroxyanthranilat Oxidase in primärer Mikroglia und Astrozyten

Kynurinase (K-ase) und 3-Hydroxyanthranilat Oxidase (3H-ase), zwei der IDO im Kynureninweg nachgeschaltete Enzyme, bilden T-Zell- und neurotoxische Tryptophanabbauprodukte (Fallarino et al., 2002B; Schwarcz und Pellicciari 2002). Mittels semiquantitativer RT-PCR wurde untersucht, ob K-ase und 3H-ase, in primären Mikroglia- und Astrozytenkulturen nach Stimulation mit IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, IFN- $\gamma$ /LPS oder IFN- $\gamma$ /LPS induziert werden.

In unstimulierten und stimulierten Mikroglia-kulturen wurden gleichstarke PCR-Banden für die 3H-ase gefunden (Abbildung 35). Die verwendeten Stimuli bewirkten keine Regulation dieses Enzyms in Mikroglia. Die K-ase konnte ebenfalls in unstimulierten Mikroglia-kulturen nachgewiesen werden. Die Stimulation mit IFN- $\gamma$  alleine, oder in Kombination mit LPS oder TNF- $\alpha$ , führte zu einer verstärkten Expression im Vergleich zur Kontrolle. Die kombinierte Gabe von TNF- $\alpha$  oder LPS mit IFN- $\gamma$  führte nicht zur Verstärkung der K-ase Expression im Vergleich zu IFN- $\gamma$  alleine. Die Stimulation mit TNF- $\alpha$  oder LPS hatte keinen Effekt auf die Expression von K-ase mRNA.

Im Vergleich zu Mikroglia kulturen konnten in Astrozyten für beide Enzyme nur schwache Signale nachgewiesen werden. Im Vergleich zu den unstimulierten Kontrollen wurde in Astrozyten die Expression der 3H-ase mRNA herunterreguliert oder blieb unverändert, wenn IFN- $\gamma$  in Kombination mit TNF- $\alpha$  oder LPS als Stimulus verwendet wurde. LPS alleine reduzierte die Transkription der beiden Enzyme unter die Nachweisgrenze. IFN- $\gamma$  führte zu einer leichten Steigerung des K-ase Signals. Im Vergleich zu Astrozyten exprimierten Mikroglia unter allen Bedingungen mehr 3H-ase und K-ase mRNA.



**Abbildung 35: Expression von Kynurinase und 3-Hydroxyanthranilat Oxidase mRNA in stimulierten Gliakulturen**

Um Mikroglia- und Astrozytenkulturen zu stimulieren, wurden den Kulturmedien IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , LPS, IFN- $\gamma$ /LPS oder IFN- $\gamma$ /LPS für 24 Stunden zugegeben. Als Kontrolle dienten unstimulierte Zellkulturen. In den beiden oberen Reihen sind die PCR-Produkte für die 3H-ase und K-ase dargestellt. Die PCR-Produkte des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin sind in der unteren Zeile dargestellt. In Mikroglia konnte nach den verschiedenen Stimulationen keine Regulation der 3H-ase nachgewiesen werden. In Mikroglia kulturen, die mit IFN- $\gamma$  inkubiert wurden, ließ sich für K-ase eine Steigerung der mRNA Expression nachweisen. In diesen Zellen erhöhte die Stimulation mit IFN- $\gamma$  in Kombination mit TNF- $\alpha$  oder LPS die 3H-ase mRNA Transkription, während in LPS behandelten Kulturen für beide Enzyme keine Signale mehr nachweisbar waren. In IFN- $\gamma$  stimulierten Astrozyten konnte ein stärkeres K-ase Signal als in der Kontrolle nachgewiesen werden.

#### **4.10 mRNA Expression am Kynureninweg beteiligter Enzyme in der EAE**

Um die Expressionsmuster der K-ase und 3H-ase während der EAE zu untersuchen, wurden Milz- und Rückenmarkproben von immunisierten SJL Mäusen mittels RT-PCR auf die Expression von IDO, K-ase und 3H-ase

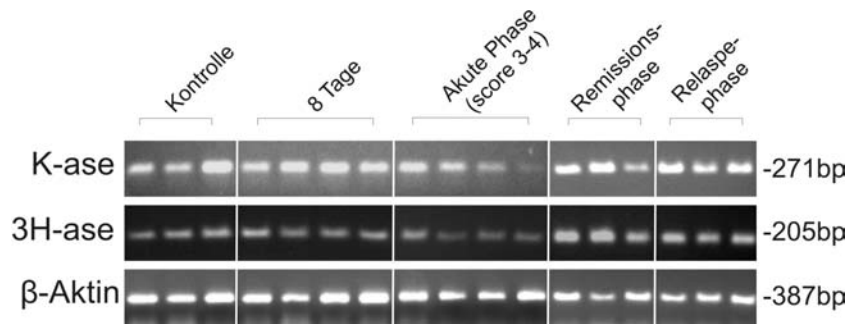


mRNA analysiert. Die Zeitpunkte der Organentnahmen und die entsprechenden klinischen Stadien sind in Tabelle 10, Kapitel 4.1.1 angegeben.

#### 4.10.1 Kynurinase und 3-Hydroxyanthranilat Oxidase mRNA Expression während EAE

Im EAE Maus-Modell wurden in vivo neben der IDO weitere an der Tryptophandegradation beteiligte immun-suppressive Enzyme, wie die 3-Hydroxykynurenin Oxidase und die Kynurinase (siehe Kapitel 1.4.4), mittels semiquantitativer RT-PCR auf RNA Niveau über den zeitlichen Verlauf der EAE untersucht.

Analog zu den in Kapitel 4.1.1 beschriebenen Versuchen zur IDO Transkription wurde nun mittels konventioneller semiquantitativer RT-PCR analysiert, ob K-ase und 3H-ase ebenfalls in der EAE reguliert werden. Je Zeitpunkt wurden 3 oder 4 Tiere verwendet, die einzeln analysiert wurden. Jede Spalte der PCR Amplifikate entspricht der gesamten RNA aus der Milz oder dem Rückenmark eines Tieres.

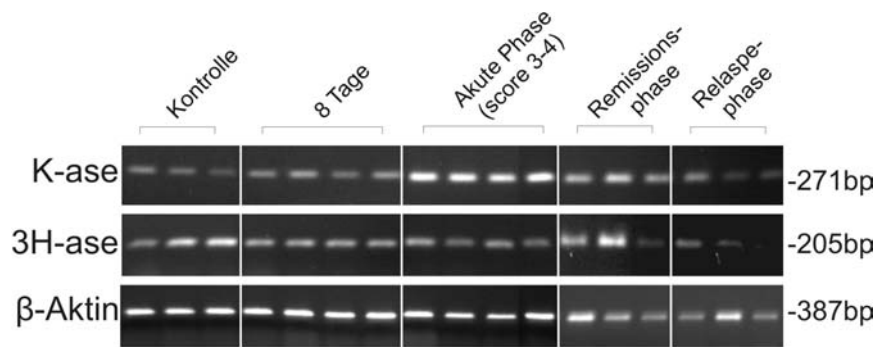


**Abbildung 36: mRNA Regulation von 3H-ase und K-ase in der Milz im Verlauf der EAE**

RT-PCR Produkte der Kynurinase und 3-Hydroxyanthranilat Oxidase in der Milz während unterschiedlicher Stadien der EAE. Jede Spalte repräsentiert die PCR-Produkte der Milz eines Tieres mit der zugehörigen PCR des Haushaltgens  $\beta$ -Aktin. In der vorklinischen Phase (Tag 8) waren keine Veränderungen der beiden Enzym-mRNA nachzuweisen, während in der akuten Phase in drei von vier Tieren die K-ase mRNA deutlich verringert war. In der Remissionsphase ist die Menge der 3H-ase mRNA in zwei von drei Tieren deutlich erhöht, wobei die K-ase das Expressionslevel der nicht immunisierten Kontrolltiere erreicht. In den Proben, die zum Zeitpunkt des chronischen Relapse entnommen wurden, konnte im Vergleich zu den Kontrollen keine Änderung der mRNA der beiden Enzyme beobachtet werden.

Während der vorklinischen Phase (8 Tage nach Immunisierung) wurde in der Milz genauso viel Transkript der beiden Enzyme festgestellt, wie in den unbehandelten Kontrolltieren. In der akuten Phase waren im Vergleich zu den Kontrolltieren jeweils in drei von vier Tieren die K-ase und 3H-ase mRNA deutlich verringert. Die Menge der nachgewiesenen K-ase und 3H-ase mRNA in zwei von drei Tieren war in der Remissionsphase erhöht, wobei nur zwei der Tiere eine Erhöhung im Vergleich zu den Kontrolltieren der K-ase zeigte. Zu Beginn der chronischen Relapsphase lag die Menge der nachgewiesenen mRNA beider Enzyme wieder in der Größenordnung der nicht immunisierten Kontrolltiere. Aufgrund der relativ starken Schwankungen der PCR-Produktmengen innerhalb einer Gruppe lässt sich keine klare Aussage über die Enzymexpression in der akuten Phase ableiten.

Während in der vorklinischen Phase (8 Tage nach Immunisierung) die Expression der K-ase und 3H-ase im Rückenmark nicht beeinflusst war (Abbildung 37), war ein deutlicher Anstieg der K-ase mRNA Menge in der akuten Phase der Krankheit nachweisbar. Die 3H-ase wurde auch in der akuten Phase nicht verstärkt exprimiert. In der Remissionsphase blieb die Expression der K-ase weiterhin erhöht. Die Analyse der 3H-ase während der Remissionsphase ergab ein sehr inhomogenes Bild. Das Enzym war in einem Rückenmark verstärkt exprimiert, während dies in den anderen beiden Tieren nicht der Fall war. Für beide immunsupprimierend wirkenden Enzyme konnte in der chronischen Relapsephase eine verringerte Expression gezeigt werden.



**Abbildung 37: mRNA Regulation von 3H-ase und K-ase im Verlauf der EAE im Rückenmark**  
RT-PCR Produkte der Kynurinase und 3-Hydroxyanthranilat Oxidase im Rückenmark während unterschiedlicher Stadien der EAE. Jede Spalte repräsentiert die PCR-Produkte des Rückenmarks eines Tieres mit der zugehörigen PCR des Haushaltsgens  $\beta$ -Aktin. 8 Tage nach Immunisierung, der vorklinischen Phase, sind keine Veränderungen der Signalintensitäten der beiden PCR Produkte nachweisbar. Zum Zeitpunkt der ersten klinischen Symptome in der akuten Phase war die Neusynthese von K-ase mRNA deutlich gesteigert. Dies konnte ebenfalls in der Remissionsphase nachgewiesen werden, während zu diesem Zeitpunkt keine eindeutige Regulation der 3H-ase zu ermitteln war. Für beide Enzyme konnte in der chronischen Relapsephase in zwei von drei Tieren eine deutliche Reduktion der mRNA Synthese belegt werden.

In den beiden untersuchten Organen wurde die K-ase während der EAE zeitlich versetzt hochreguliert. Die gesteigerte Transkription des Kynurinasegens im Rückenmark erfolgte zeitlich mit dem Auftreten der klinischen Symptome, blieb jedoch auch während der Remissionsphase gesteigert. Während den chronischen Relapse erfolgt trotz massiver Entzündungen im Rückenmark keine Expressionssteigerung der beiden immunsuppressiven Enzyme. Diese Daten stützen die Hypothese, dass die Induktion des Kynureninweges an der Unterdrückung der Entzündung im ZNS beteiligt ist.

## 5 Diskussion

### 5.1 Übersicht der Ergebnisse

Die systemische Inhibition des Tryptophan-abbauenden Enzyms IDO durch 1-Methyl-Tryptophan führt zur T-zell-vermittelten Abstoßung allogener Föten in Mäusen (Munn et al., 1998). *In vitro* inhibieren IDO exprimierende Makrophagen und dendritische Zellen die Proliferation von T-Zellen und erhöhen deren Sensitivität gegenüber Apoptoseinduktion (Lee et al., 2002). Einige auf IDO folgende Enzyme des Kynureninwegs und deren Produkte sind ebenfalls für ihre T-Zell-toxischen Wirkungen bekannt (Frumento et al., 2002; Falarino et al., 2002; Bauer et al., 2005). Diese Daten führten zu der Hypothese, dass die lokale Expression von IDO im Gewebe einen immunregulatorischen Mechanismus gegen T-zell-vermittelte Immunantworten darstellt. In der vorliegenden Arbeit wurde diese Hypothese in Bezug auf autoimmune Entzündung des ZNS im Modell der EAE geprüft.

Ein großer Teil der MS Patienten weist einen schubartigen Krankheitsverlauf auf. Dieser Krankheitsverlauf zeichnet sich durch zeitlich begrenzte Entzündungs- gefolgt von Erholungsphasen aus. Ein solcher Krankheitsverlauf legt die Existenz körpereigener immunregulatorischer Mechanismen, die den entzündungsfördernden Mechanismen entgegenwirken, nahe. Während der MS beim Menschen oder der EAE im Tier kommt es zur Einwanderung autoreaktiver T-Zellen, deren Rezeptoren spezifisch präsentierte Antigene des ZNS erkennen (Wekerle et al., 1986; Hickey et al., 1991). Im ZNS entstehen Entzündungsherde, die zum Verlust von Oligodendrozyten und der Phagozytose von Myelin führen (Smith und de Long, 1987; Benveniste 1997; Hishara et al., 2003), was sich klinisch unter anderem als motorische Störungen manifestiert. Die Schwere der Erkrankung kann in der EAE anhand der charakteristisch von caudal nach rostral aufsteigenden motorischen Ausfälle nichtinvasiv über den gesamten Untersuchungszeitraum beobachtet und quantifiziert werden (siehe Kapitel 3.6). Die Erholung von akuten MS- oder EAE-Schüben wird bislang auf die apoptotische Eliminierung autoreaktiver T-Zellen zurückgeführt (Schmied et al., 1993; Zeine und Owens, 1993; Tabi et al., 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde aktive EAE in SJL Mäusen verwendet, da nur in diesem Modell der schubförmige Verlauf der MS nachgestellt werden kann.

Anhand von *in vivo* Experimenten konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die relative IDO Aktivität während der EAE lokal im ZNS anstieg (siehe Abbildung 13 + 14). Die Inhibition der IDO Aktivität führte zu einer Verstärkung des Krankheitsverlaufs (siehe Abbildung 16). Mittels Immunfärbungen konnten IDO exprimierende Zellen im Rückenmark akut erkrankter Mäuse identifiziert werden, die in ihrer Größe und Morphologie aktivierten Mikroglia/Makrophagen entsprachen (siehe Abbildung 19). Das Mikroglia IDO exprimierende Zellen darstellen, konnte *in vitro* nachgewiesen werden (siehe Abbildung 27 + 29 + 30), während sich kein Hinweis auf eine Expression in Astrozyten und Neuronen ergab.

### 5.2 IDO wird im ZNS während der EAE exprimiert

Die EAE stellt eine Th1-Zell vermittelte Autoimmunerkrankung des ZNS dar. Diese Zellen exprimieren während der EAE große Mengen des proinflammatorischen Zytokins IFN- $\gamma$ . Aus der Literatur ist bekannt, dass dieses Zytokin verantwortlich ist für die Induktion von IDO (Pfeffekorn et al., 1984). Daher wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht, ob IDO eine Rolle in der EAE spielt.

Die relative IDO-Aktivität wurde während der EAE organspezifisch mittels HPLC im ZNS untersucht. Nur mit dieser Methode ist es möglich, sowohl das Substrat Tryptophan als auch dessen Abbauprodukt Kynurenin sensitiv genug nachzuweisen, um die relative IDO Aktivität im Gewebe zu beschreiben. Die Bestimmung der relativen IDO Aktivität erfolgte über die Bildung des Quotienten des Abbauproduktes Kynurenin zum Substrat Tryptophan (Widner et al., 1997).

Dendritische Zellen aus der Milz sind in der Lage IDO zu exprimieren (Munn et al., 2002; Fallarino et al., 2002B). Wie bereits erwähnt exprimieren aktivierte Th1 Zellen große Mengen an IFN- $\gamma$ , welches in Makrophagen, Fibroblasten und dendritischen Zellen die Expression von IDO induziert (Pfeffekorn et al., 1984; Carlin et al., 1989; Currier et al., 2000; Robinson et al., 2003, Fallarino et al., 2002A). Daher wurden von den immunisierten Tieren nicht nur die entzündeten Gewebe Rückenmark und Großhirn, sondern auch die Milz untersucht. Als Kontrollen wurden Proben von nicht immunisierten Tieren verwendet.

Im Blut befinden sich hohe Konzentration von Tryptophan und Kynurenin (Saito et al., 1991). Die Tryptophankonzentration im Blut wird durch die in der Leber exprimierte TDO reguliert. Durch die intraperitoneale Injektion von Adjuvantien wird die TDO verstärkt aktiviert (Espey et al., 1995; Espey und Namboodiri, 2000), was eine gesteigerte Kynureninkonzentration im Blutserum zur Folge hat. Um auszuschließen, dass Tryptophan und Kynurenin aus dem Blut über Aminosäuretransporter (Speziale et al., 1989) durch die Blut-Hirn-Schranke transportiert wird (Boado et al., 1999) und fälschlicherweise auf eine verstärkte IDO Aktivität geschlossen werden würde, wurden auch im Blut die Konzentrationen von Tryptophan und Kynurenin bestimmt.

Ausschließlich in der Milz konnte bereits vier Tage nach Immunisierung ein signifikanter Anstieg der IDO Aktivität gemessen werden. Zu allen späteren Zeitpunkten (8 Tage nach Immunisierung, akute-, Remissions- und Relapsephase) konnte kein signifikanter Unterschied in der Milz mehr festgestellt werden. Im Blutserum stieg der Kynurenin-Tryptophan-Quotient in der akuten Erkrankungsphase signifikant gegenüber den Kontrolltieren an, das heißt, zu einem Zeitpunkt, an dem die IDO Aktivität in der Milz wieder auf dem Niveau der Kontrolle lag. Während der Erholungs- und der Relapsephase sank der Quotient unter die in den Kontrolltieren ermittelten Werte. Im Rückenmark war ab dem 8. Tag nach Immunisierung die relative IDO Aktivität signifikant erhöht und erreichte ihr Maximum in der Remissionsphase, einem Zeitpunkt zu dem die Werte des Blutserums unter denen der Kontrolltiere lagen. Die späteste Aktivitätssteigerung konnte im Großhirn festgestellt werden. Während der akuten-, der Remission- und der Relapsephase blieb die relative IDO Aktivität erhöht im Vergleich zur Kontrolle.

Das hier gefundene Ergebnis zeigt, dass die Immunisierung zu einer verstärkten Expression von IDO in der Milz führt. Möglich ist, dass die durch die Immunisierung entstehenden Th1 Zellen IFN- $\gamma$  produzieren, was die Expression von IDO in den dortigen dendritischen Zellen induziert. Eine andere Erklärung ist, dass das Immunisat die dendritischen Zellen direkt zur IDO Expression stimuliert. So werden dendritische Zellen durch Zellwandbestandteile von *Mycobacterium Tuberculosis* aktiviert (Baird et al., 1995). Welcher Mechanismus zutrifft, muß in weiteren Experimenten untersucht werden.

Der beobachtete Anstieg der relativen IDO Aktivität im Blutserum könnte auf die Induktion der TDO in der Leber durch *Mycobacterium Tuberculosis* Bestandteile zurückzuführen sein, das wie LPS über das Toll-like-Rezeptor 1-2 –Dimer wirkt (Janssens und Beyaert, 2003; Espey et al., 1995; Espey und Namboodiri, 2000). Das Immunisat könnte somit zu einer Verstärkung der TDO Aktivität in der Leber führen, die im Blut eine Verschiebung des Kyn/Trp Quotienten zur Folge hätte.

Ein signifikanter Anstieg der relativen IDO Aktivität konnte zuerst im Rückenmark (8 Tage nach Immunisierung) und erst 5 Tage später (akute Phase) im Großhirn festgestellt werden., was der Kinetik der Infiltration des ZNS in der EAE entspricht. Cross und Mitarbeiter zeigten, dass in der EAE Leukozyten erst in das Rückenmark und später in das Großhirn einwandern (Cross et al., 1993). Eine scheinbare IDO Aktivität in den ZNS Proben durch Serulkynurenin oder Serulkryptophan kann ausgeschlossen werden, da die Aktivitätsmaxima zu unterschiedlichen Zeitpunkten auftraten. Es ist also zu vermuten, dass IDO innerhalb des ZNS als Reaktion auf die Einwanderung von Th-1 in der EAE aktiviert wird. Die gesteigerte IDO Aktivität konnte im ZNS im Zeitraum der akuten- und der Remissionsphase gefunden werden.

Ein grundlegender Mechanismus der Erholung von einem akuten Schub ist die Elimination autoreaktiver T-Zellen (Schmied et al., 1993; Zeine und Owens, 1993, Tabi et al., 1994, 1995). Die verstärkte IDO Aktivität könnte zum Verarmen von Tryptophan im Gewebe führen (Tryptophanverarmungshypothese, siehe Kapitel 1.4, Munn et al., 1998, 1999), was zu einer reduzierten T-Zellproliferation führen und Th1-Zellen empfänglicher gegenüber CD-95L induzierter Apoptose machen könnte. In der Peptid-induzierten EAE konnte bis heute keine Proliferation von T-Zellen im ZNS nachgewiesen werden (Ohmori et al., 1992, Kang et al., 2000). Tatsächlich stellt der Todesligand CD-95L einen wichtigen Mechanismus für die Elimination autoreaktiver T-Zellen aus dem ZNS dar (Sabelko-Downes et al., 1999). Da aktivierte T-Zellen unter Tryptophanmangel nicht proliferieren und sensitiv gegenüber CD-95L induzierte Apoptose werden (Lee et al., 2002) könnte die Steigerung der IDO Aktivität im ZNS im großen Maße während der akuten und der Remissionsphase auf diesem Weg an der klinischen Erholung beteiligt sein.

Die Induktion des Kynureninweges über die IDO wurde bisher als ZNS schädigend betrachtet, da entlang dieses Stoffwechselweges auch neurotoxische Tryptophanabbauprodukte wie Quinolsäure entstehen. So konnte in Patienten mit einer AIDS-Enzephalitopathie, als auch in SIV infizierten Rhesusaffen ein Anstieg von Tryptophanabbauprodukten oder die Expression von IDO in den Entzündungszentren nachgewiesen werden (Heyes et al., 1992, 1998, 2001; Rausch et al., 1994; Depboylu et al., 2004). Aufgrund des chronischen Entzündungsverlaufs dieser Erkrankungen wird davon ausgegangen, dass eine langanhaltende Induktion des Kynureninweges vorliegt, während der kontinuierlich neurotoxische Intermediate gebildet werden (Heyes et al., 2001). Die in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Daten zeigen, dass die relative IDO Aktivität zeitlich und örtlich begrenzt in den verschiedenen untersuchten Organen gesteigert wird. Durch diese kurzzeitige Synthese der toxischer Substanzen ist ein neuronale Schaden im ZNS eher unwahrscheinlich. Diese Hypothese wird durch die mRNA Expression von IDO im Rückenmark gestützt. Hier konnte nur in der akuten Erkrankungsphase ein verstärkte IDO Expression nachgewiesen werden, und nicht zu einem späteren Zeitpunkt der Erkrankung.

Um zu überprüfen, ob die IDO Aktivität im Modell der EAE positiv oder negativ auf den Krankheitsverlauf der EAE wirkt, wurden die IDO Aktivität systemisch mit 1-Methyl-Tryptophan inhibiert (Munn et al., 1998). Der Inhibitor konnte aufgrund seiner schlechten Löslichkeit nicht lokal in die Liquorräume des ZNS wie z.B. die *Cisterna magna* appliziert werden. Die Behandlung begann in der akuten Phase (Tag 12), dem Zeitpunkt, zu dem eine gesteigerte IDO Aktivität im Rückenmark und Großhirn nachweisbar war (siehe Kapitel 4.1). Dieses Vorgehen sollte eine Beeinflussung der Entstehung autoreaktiver T-Zellen in den primären lymphatischen Organen vermeiden, da in der Milz bereits 4 Tage nach Immunisierung eine gesteigerte IDO Aktivität nachgewiesen wurde (siehe Kapitel 4.1). Der Vergleich der mittleren klinischen Schweregrade von Kontrollgruppen und den mit dem IDO Inhibitor behandelten Gruppen ergab eine signifikante Steigerung der klinischen Symptome in IDO

inhibierten Tieren. Es konnte gezeigt werden, dass mit der Trägersubstanz behandelte Tiere (Kontrollen) eine deutlich bessere Erholung von den klinischen Symptomen aufwiesen, und auch die chronische Relapsephase signifikant schwächer ausfiel als in mit Inhibitor behandelten Tieren. Der klinische Effekt der Enzyminhibition auf die Erkrankung und die zuvor beschriebene IDO Aktivitätssteigerung im Rückenmark und Großhirn während der Akuten- und der Erholungsphase lassen die Schlussfolgerung zu, dass die Hochregulation der IDO an der spontanen Erholung der ZNS Entzündung *in vivo* beteiligt ist. Eine Publikation die während der Anfertigung der hier vorliegenden Arbeit veröffentlicht wurde, zeigte ebenfalls eine Beteiligung der IDO am klinischen Verlauf der EAE (Sakurai et al., 2002). In dieser Arbeit wurde nicht wie hier die aktive EAE verwendet, sondern das passive durch den adoptiven Transfer autoreaktiver T-Zellen induzierte EAE. Dieses EAE Modell führt nicht zu einem schubförmigen Verlauf der Erkrankung mit chronischen Relapse. Trotzdem können ähnliche Ergebnisse wie in der vorliegenden Arbeit erzielt werden, das heißt, nicht die Art der Immunisierung ist entscheidend, sondern die T-zell-vermittelte autoimmune Entzündung des ZNS. Im Gegensatz zu der vorliegenden Arbeit erfolgte die Behandlung mit dem IDO Inhibitor allerdings zeitgleich mit der Induktion der EAE. Dies hat zur Folge, dass ein Einfluss der Inhibition auf das periphere Immunsystem während der vorklinischen Phase nicht ausgeschlossen werden kann.

Die Inhibition von IDO in der EAE führte zu einer Verschlechterung des Krankheitsverlaufs. Im Gegensatz zu den in der AIDS Enzephalopathie beschriebenen neurotoxischen Effekten von IDO (Heyes et al., 1992, 1998, 2001; Rausch et al., 1994; Depboylu et al., 2004), stellt die Aktivierung von IDO in der EAE einen immunregulatorischen, d. h. in seiner Summe protektiven Mechanismus dar. Diese Ergebnisse widerlegen die bisherige Annahme, dass eine IDO Aktivierung im ZNS immer schädliche Auswirkungen haben muss.

### **5.3 IDO wird unter EAE von Makrophagen/Mikroglia im Rückenmark exprimiert**

Aus den vorherigen Experimenten konnte eine Beteiligung von IDO am Krankheitsverlauf der EAE nachgewiesen werden. Bisher war jedoch nicht bekannt, welcher Zelltyp im ZNS IDO exprimiert. Hierfür wurden Rückenmarksquerschnitte von nicht immunisierten und akut erkrankten Tieren mit dem IDO spezifischen Antiserum immunhistochemisch angefärbt. In den Rückenmarksquerschnitten nicht immunisierter konnten keine IDO positiven Zellen nachgewiesen werden. In Präparaten akut erkrankter Tiere wurden „amöboide“ Zellen mit dem Antiserum markiert (Abbildung 8). Diese im Durchschnitt 10µm großen, IDO positiven Zellen waren ausschließlich in den von den Leukozyteninfiltraten betroffenen Regionen nachweisbar. Die Färbung von Folgeschnitten mit dem Mikroglia/Makrophagen Marker Iba1 zeigte sowohl teilweise aktivierte (schwach ramifizierte) Mikroglia als auch Zellen die in Größe und Form den IDO positiven Zellen entsprachen. Eine direkte Doppelmarkierung von Mikroglia und IDO exprimierenden Zellen war nicht möglich, da sowohl das IDO Antiserum, als auch der Iba1 Antikörper aus Kaninchen stammten. Das für die Mikroglia Markierung in der Zellkultur verwendete Isolektin GFS-IB4 oder das in der Literatur häufig verwendete Mac-1 ergaben in Paraffin-Schnittpräparaten keine Signale. Aufgrund der Größe und Morphologie der IDO positiven Zellen konnte davon ausgegangen werden, dass es sich bei diesen markierten Zellen um aktivierte Mikroglia/Makrophagen oder dendritische Zellen handelt, während immunpositive Astrozyten oder Neurone nicht detektiert wurden.

Die Mikroglia stellt den gewebständigen Makrophagen des ZNS dar. Sie wird aufgrund pathologischer Prozesse als erster Zelltyp des ZNS aktiviert (Gehrmann et al., 1995; Kreutzberg, 1996; Benveniste, 1997). Nach erfolgter

Aktivierung ist es morphologisch nicht mehr möglich, eindeutig zwischen einer Mikroglia und einem eingewanderten Makrophagen zu unterscheiden (Guillemin und Brew 2004, Bechmann et al., 2005). Eine Möglichkeit um in zukünftigen Experimenten Makrophagen und Mikroglia voneinander unterscheiden zu können, wäre die Verwendung GFP transfizierten Knochenmarks Chimären (Priller et al., 2001). In diesen Tieren können aus dem Blut stammenden Leukozyten anhand ihrer GFP Expression identifiziert werden. So wäre es möglich, GFP positive, also eingewanderte, Makrophagen von intrinsischer Mikroglia zu unterscheiden.

STAT1 stellt in Makrophagen den für die Aktivierung des IDO-Gens verantwortlichen Transkriptionsfaktor dar (Du et al., 2000; Sotero-Esteva et al., 2000). Um das zuvor mit dem IDO-Antiserum erzielte Ergebnis zu unterstützen, wurde die Aktivierung von STAT1 innerhalb der Leukozyteninfiltrate untersucht. Phosphoryliertes STAT1 konnte wie IDO in den Leukozyteninfiltraten des Rückenmarks erkrankter Tiere nachgewiesen werden (siehe Abbildung 9). Dabei entsprach die Signalverteilung von STAT1 der des IDO Antiserums. Dies wird als unterstützender Befund gewertet, dass Mikroglia/Makrophagen tatsächlich die zelluläre Quelle von IDO im ZNS darstellen.

## **5.4 Mikroglia stellen *in vitro* eine Quelle ZNS spezifischer IDO Expression dar**

Aufgrund der Beobachtung, dass IDO positive Zellen im akut entzündeten Rückenmark immunisierter Tiere auftraten, sollte in primären Zellkulturen ZNS spezifischer Zellen die Induzierbarkeit von IDO untersucht werden. In Zellkultur können zahlreiche Zelltypen, wie Fibroblasten, Monozyten und dendritische Zellen, durch Inkubation mit IFN- $\gamma$  zur Expression von IDO angeregt werden, wobei ein synergistischer Effekt bei zeitgleicher Stimulation von IFN- $\gamma$  mit TNF- $\alpha$  oder IFN- $\gamma$  mit LPS beschrieben wurde (Carlin et al., 1989; Currier et al., 2000; Robinson et al., 2003). IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  sind an der Th-1 vermittelten EAE maßgeblich beteiligt. Die genaue Wirkung der beiden Zytokine in der EAE ist bis heute noch nicht eindeutig geklärt. Zum einen werden sie unter anderem für die Öffnung der Blut-Hirn-Schranke zu Beginn der Erkrankung verantwortlich gemacht (Minagar und Alexander, 2003), jedoch weisen entsprechende Knock-out Mäuse einen stärkeren Krankheitsverlauf auf als entsprechende Wildtypiere (Ferber et al., 1996; Frei et al., 1997), was wiederum für eine immunregulatorische Funktion von IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  spricht. Eine solche immunregulatorische Funktion könnte die Aktivierung von IDO im entzündeten Gewebe darstellen.

Um die generelle Aktivierung der verwendeten Zellen zu überprüfen wurden die Zellen mittels Western-Blot auf die Expression der induzierbaren Nitritoxid-Synthetase (iNOS) bzw. auf deren Enzymaktivität mittels photometrischen Nitritnachweis überprüft. Wie aus der Literatur bekannt konnte 24 Stunden nach Inkubation in Astrozyten und Mikroglia eine deutliche Steigerungen der iNOS auf Protein- und Aktivitätseben nachgewiesen werden (siehe Kapitel 4.4). TNF- $\alpha$  alleine induzierte in Mikroglia keine signifikante Änderung der iNOS Expression. Die für die IDO Expression notwendige Phosphorylierung des Transkriptionsfaktors STAT1 (Du et al., 2000; Sotero-Esteva et al., 2000) konnte in Astrozyten und Mikroglia nachgewiesen werden, wenn diese mit IFN- $\gamma$  oder in Kombination mit TNF- $\alpha$  oder LPS kultiviert wurden. Anhand dieser Daten konnte gezeigt werden, dass die verwendeten Stimuli zur Aktivierung der Astrozyten und Mikroglia führte; die Phosphorylierung von STAT1 in beiden Zelltypen zeigt, dass beide Zelltypen in prinzipiell in der Lage sind, nach Stimulation IDO zu exprimieren.

Die semiquantitative RT-PCR Analyse primärer stimulierter Mikroglia, Astrozyten und Neurone zeigte die Synthese von IDO mRNA in Astrozyten und Mikroglia 24 Stunden nach IFN- $\gamma$  Inkubation. Dieser Effekt konnte in Mikroglia durch zusätzliche Stimulation mit TNF- $\alpha$  gesteigert werden. Neurone exprimierten unter keiner der getesteten Bedingungen nachweisbare Mengen an IDO mRNA.

Immunzytochemische Färbungen stimulierter Mikroglia zeigte eine deutliche gesteigerte Expression von IDO Protein in mit IFN- $\gamma$  und TNF- $\alpha$  behandelten Kulturen im Vergleich zu ausschließlich mit IFN- $\gamma$  stimulierten Mikroglia, während in unstimulierter Mikroglia kein IDO Signal nachgewiesen werden konnte. Die in dieser Arbeit verwendeten Mikroglia reagierten demnach wie bereits für Makrophagen beschrieben (Calin et al., 1989; Currier et al., 2000) auf die Stimulation mit den beiden verwendeten proinflammatorischen Zytokinen. Im Gegensatz zu den Mikroglia konnten kein IDO Protein in Astrozyten identifiziert werden (siehe Kapitel 4.7). Die in der RT-PCR amplifizierte IDO mRNA dürfte daher von einigen Mikroglia stammen, die als unvermeidbare Verunreinigung in den primären Astrozytenkulturen vorlagen.

Die in der Zellkultur gewonnenen Daten konnten die Hypothese, dass die IDO exprimierenden Zellen im entzündeten Rückenmark ZNS spezifische Mikroglia darstellen unterstützen.

## **5.5 Regulation der IDO durch Zytokinexpression in der EAE**

Um Aussagen über die *in vivo* Bedingungen der IDO Expression zu erhalten wurden die Zytokine IFN- $\gamma$ , IL-10 und das Enzym iNOS im ZNS mittels semiquantitativer „real time“ PCR im ZNS untersucht. Anhand der Versuche in Zellkultur konnte gezeigt werden, dass IFN- $\gamma$  die Expression von IDO in Mikroglia induziert (siehe Kapitel 4.7). Auf mRNA Ebene stieg die Expression dieses Zytokins in der akuten Erkrankungsphase im ZNS an, wobei im Rückenmark ein stärkerer Anstieg als im Großhirn vorlag (siehe Kapitel 4.1). Die relative IDO Aktivität steigt im ZNS analog der Expression von IFN- $\gamma$  an. Da jedoch im ZNS die stärkste relative IDO Expression während der Remissionsphase nachgewiesen wurde und die Menge an IFN- $\gamma$  mRNA hier im Vergleich zur akuten Phase rückläufig war, ist davon auszugehen, dass weitere Faktoren an der Regulation von IDO beteiligt sind. Einen potentiellen Kandidaten, der die IDO Aktivität auf Proteinebene hemmen kann, stellt die iNOS dar. Das von diesem Enzym synthetisierte Nitrit kann das aktive Zentrum von IDO oxidieren und so den Tryptophanabbau blockieren (Thomas et al., 1994). Nitrit beeinflusst auch die Stabilität des IDO Proteins und fördert dessen proteolytischen Abbau in humanen Zelllinien (Hucke et al., 2004). In der akuten Krankheitsphase wurde die höchste Menge an iNOS mRNA nachgewiesen. Folglich könnte eine verstärkte Nitrit-Synthese den enzymatischen Abbau des Tryptophans durch die IDO teilweise reduziert haben. Ein solcher Effekt erscheint in der Remissionsphase eher unwahrscheinlich, da hier keine gesteigerte iNOS mRNA Expression mehr nachweisbar war. Im Rückenmark verringerte sich die Menge an iNOS Transkript während der Remissionsphase im Vergleich zur akuten Phase (siehe Kapitel 4.8.2), was das IDO Aktivitätsmaximum im Rückenmark während der Remissionsphase erklären kann. Dieser Effekt konnte im Großhirn nicht eindeutig nachempfunden werden: Hier war die iNOS Expression während der akuten und der Remissionsphase ebenso wie die relative IDO Aktivität erhöht. Sowohl relative IDO Aktivität als auch iNOS mRNA waren im Großhirn geringer als im Rückenmark, so dass die Beeinflussung von IDO durch das synthetisierte Nitrit unterhalb der Nachweisgrenze gelegen haben dürfte.

Die im Vergleich zur akuten und Relapsephase geringere IDO Aktivität in der chronisch verlaufenden Relapsephase kann mit diesem Modell nicht eindeutig erklärt werden, da in der Relapsephase erhöhte IFN- $\gamma$  Mengen nachgewiesen werden konnten, während die iNOS mRNA Expression unterhalb der Nachweisgrenze lag



(siehe Kapitel 4.8). Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass neben aktivierten Mikroglia/Makrophagen auch dendritische Zellen an der IDO Expression während der EAE beteiligt sind. So wurden im entzündeten ZNS von EAE immunisierten Mäusen reife dendritische Zellen nachgewiesen (Serafini et al., 2000). Die Funktion von dendritischen Zellen im ZNS während der EAE wird zur Zeit kontrovers diskutiert. So konnte gezeigt werden, dass diese Zellen inhibitorisch auf T-Zellen wirken (Suter et al., 2000) und dass sie für die Rekrutierung von Leukozyten in das ZNS verantwortlich sind (Serafini et al., 2000). In Zellkultur exprimieren reife dendritische Zellen konstitutiv IDO, diese Expression wird jedoch durch Inkubation mit IFN- $\gamma$  verhindert. Erfolgt jedoch die Kultivierung dieser Zellen mit IL-10 so wird durch zusätzliche Stimulation mit IFN- $\gamma$  die Expression von IDO gesteigert (Munn et al., 2002). Da nur während der akuten- und der Remissionsphase die verstärkte Expression von IL-10 vorlag, könnten neben den Mikroglia / Makrophagen auch dendritische Zellen an der Expression von IDO beteiligt sein, die ohne IL-10 in der chronischen Relapsephase die IDO Expression einstellen.

## **5.6 Expression immunregulatorischer Enzyme des Kynureninweges *in vitro* und *in vivo***

Die IDO stellt zwar das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Kynureninweges dar (Moffet und Nambodiri, 2003), allerdings werden im Verlauf dieses Stoffwechselweges noch zwei weitere T-zell-toxische Intermediate gebildet (Fallarino et al., 2002B). Diese zwei Substanzen, die 3-Hydroxyanthranilin Säure und die Quinolsäure, werden durch die Kynurinase bzw. durch die 3-Hydroxyanthranilatoxidase gebildet.

Mittels semiquantitativer RT-PCR konnte eine schwache Regulation und Expression der beiden Enzyme in primären Astrozytenkulturen gezeigt werden, während in primären Mikroglia kulturen die mRNA Signale stets stark und nicht reguliert vorlagen (siehe Kapitel 4.9). Die Mikroglia stellt offenbar im Vergleich zu Astrozyten auch in Bezug auf den weiteren Kynureninweg den hauptsächlich beteiligten Zelltyp dar. In einer aktuellen Arbeit konnte in primären humanen Zellen die Expression von IDO in Neuronen, Astrozyten und Mikroglia gezeigt werden, wobei die höchste IDO Aktivität in stimulierten Mikroglia kulturen vorlag (Guillemin et al., 2004)

In der Milz wurden sowohl die 3-Hydroxyanthranilatoxidase als auch die Kynurinase während der akuten Phase in 3 von 4 Tieren schwächer und während der Remission in 2 von 3 Tieren stärker exprimiert als in den Kontrollen. Da die Entfernung autoreaktiver T-Zellen aus der Peripherie einen wichtiger Teil der Erholungsphase ist (Schmied et al., 1993; Zeine und Owens, 1993; Tabi et al., 1995), könnte die hier beobachtete Steigerung der Expression beider Enzyme einen Mechanismus darstellen, der für die Elimination der T-Zellen verantwortlich ist.

Im Rückenmark immunisierter Mäuse konnte ein Anstieg der Kynurinase mRNA in der akuten Phase nachgewiesen werden. In der Remissionsphase wurden sowohl Kynurinase als auch 3H-ase verstärkt exprimiert, während die mRNAs der beiden Enzyme in der chronischen Relapsephase wieder so schwach wie in nicht immunisierten Kontrolltieren exprimiert wurden. In Bezug auf den Krankheitsverlauf würde die verstärkte Expression der beiden untersuchten Schlüsselenzyme eine lokale Konzentrationssteigerung der von ihnen synthetisierten Tryptophanmetabolite zur Folge haben. Da die 3-Hydroxyanthranilin Säure und die Quinolsäure toxisch auf Th1-Zellen wirken (Fallarino et al., 2002B) stellt sie gesteigerte Expression der Kynurinase und 3-Hydroxyanthranilatoxidase einen guten Kandidatenmechanismus für die Regulation der durch Th1-Zellen vermittelten autoimmunen Entzündung des ZNS dar.

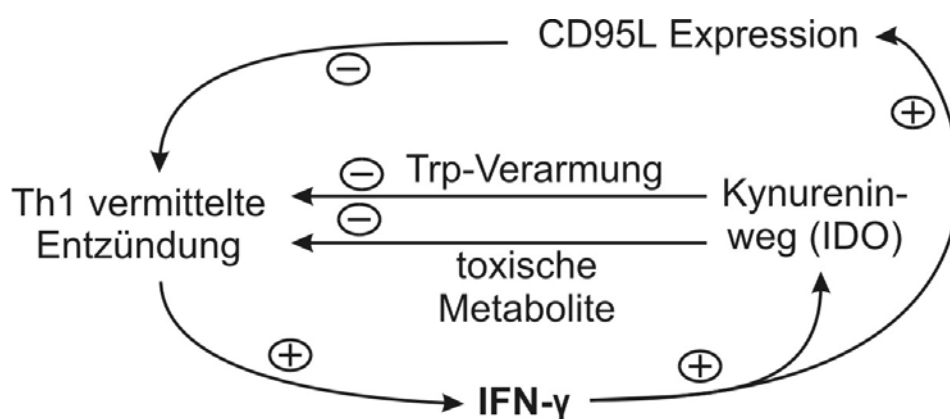
## 6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass Mikroglia als gehirnständige Makrophagen *in vitro* nach Stimulation mit IFN- $\gamma$  IDO exprimieren. Die Entzündung im ZNS während der EAE induziert die Expression und Aktivität der IDO im ZNS durch aktivierte Mikroglia/Makrophagen. Durch die pharmakologische Inhibition der IDO konnte die Beteiligung des untersuchten Enzyms am Krankheitsverlauf der EAE *in vivo* demonstriert werden. Des weiteren konnte gezeigt werden, dass zwei am Kynureninweg beteiligte Enzyme auf RNA Ebene während der akuten und der Remissionsphase verstärkt exprimiert wurden, was jedoch nicht in der chronischen Relapsephase der Fall war.

Es existieren zwei Erklärungsansätze, wie die Induktion des Kynureninweges immunsupprimierend wirken kann. Geht man von der Tryptophanverarmungstheorie aus (Munn et al., 1998), so würde die lokal gesteigerte IDO Expression in den Leukozyteninfiltraten die Sensitivität der eingewanderten T-Zellen gegenüber dem Todesliganden CD95L erhöhen. CD95L wird von Astrozyten im gesunden und geschädigten Gehirn exprimiert (Bechmann et al., 1999, 2000, 2002), des weiteren kann im ZNS die Expression von CD95L durch IFN- $\gamma$  induziert werden (Choi et al., 1999), was die Entfernung aktivierter T-Zellen aus dem ZNS-Parenchym auslöst (Suvannavejh et al., 2000). Ein weitere Effekt von Tryptophanmangel auf T-Zellen ist die Proliferationsinhibition (Munn et al., 1999) was die Verhinderung der klonalen Expansion autoreaktiver T-Zellen im ZNS als Folge hätte. Dieses Erklärungsmodell stimmt mit den Beobachtungen überein, dass zum einen CD95 an der Einleitung der Remissionsphase beteiligt ist (Suvannavejh et al., 2000). Ebenfalls konnte bis heute in mit Peptiden immunisierten Tieren keine Proliferation von T-Zellen im ZNS nachgewiesen werden (Ohmori et al., 1992; Kang et al., 2000). Da es bis heute nicht möglich ist, das in der Tryptophanverarmungstheorie postulierte Mikroklima im Gewebe nachzuweisen, kann diese Theorie weder be- noch widerlegt werden. Aus physiologischer Sicht ist ein solches Mikroklima allerdings eher unwahrscheinlich, da die genannten inhibitorischen Effekte auf T-Zellen in Kultur nur bei einer Tryptophankonzentration unter  $1\mu\text{M}$  und einer Inkubation über mehrere Stunden zu beobachten sind. Die Serumkonzentrationen von Tryptophan liegen *in vivo* zwischen  $50\text{--}100\mu\text{M}$ , so dass es auch bei hoher IDO Aktivität eher unwahrscheinlich erscheint, dass trotz aktivem Tryptophantransportes über die Blut-Hirn-Schranke und Diffusion solch niedrige Konzentration aufrecht erhalten lassen (Moffett und Namboodiri, 2003).

Die zweite Theorie zur immunsuppressiven Wirkung der IDO geht davon aus, dass nicht die IDO Aktivität direkt, sondern später im Kynureninweg gebildete Abbauprodukte toxisch auf Th1-Zellen wirken (Fallarino et al., 2002B). In der diese Theorie unterstützenden Studie konnte gezeigt werden, dass 3-Hydroxyanthranilin Säure und Quinolsäure, *in vitro* CD95 unabhängig Apoptose in Th1-Zellen induzieren. Im Tierexperiment führte die Gabe dieser Substanzen zur Deletion einiger Thymozytensubpopulationen ähnlich wie bei der Verwendung des Cortisonderivates Dexamethason (Fallarino et al., 2002B). Geht man von diesem Erklärungsmodell aus, so wird die IDO als Antwort auf die Entzündung induziert, was jedoch keinen direkten Einfluss auf den Krankheitsverlauf der EAE darstellt. Erst wenn in späteren Reaktionen des Kynureninweges Th1-Zell toxische Tryptophanmetabolite synthetisiert werden, erfolgt die apoptotische Eliminierung der autoreaktiven T-Zellen aus dem ZNS. Somit würde die gesteigerte Expression der K-ase in der akuten Phase und der K-ase und 3H-ase in der Remissionsphase die Entfernung der autoreaktiven Th1-Zellen ermöglichen. Der Einfluss von Tryptophanmetaboliten und die Expression am Kynureninweg beteiligter Enzyme während der EAE sollen in folgenden Arbeiten untersucht werden, da sich hierfür nun gute Hinweise ergeben haben.

Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann zusammenfassend ein, die autoimmune Entzündung limitierender, Rückkopplungsmechanismus postuliert werden (Abbildung 38). Die das ZNS infiltrierenden Th1 Zellen exprimieren das proinflammatorische Zytokin IFN- $\gamma$ , welches aus Astrozyten die Expression des Todesliganden CD95L induziert (Bechmann et al., 2000), der an der Entfernung autoreaktiver T-Zellen im ZNS beteiligt ist (Suvannavejh et al., 2000). Ebenfalls induziert IFN- $\gamma$  das geschwindigkeitsbestimmende Enzym des Kynureninweges, die IDO. Die lokale Expression von IDO durch Mikroglia/Makrophagen könnte zu einer lokalen Verarmung an Tryptophan führen und somit die Empfindlichkeit der T Zellen gegenüber CD95L induzierter Apoptose steigern (Lee et al., 2002). Durch die Aktivierung des Kynureninweges kann es zur gesteigerten Synthese von Tryptophanmetaboliten kommen, die toxisch auf T Zellen wirken (Fallarino et al., 2002B). Somit induzieren Th1 Zellen selber im ZNS offenbar einen negativ-regulierenden Mechanismus, der das weitere Fortschreiten der Entzündung im ZNS vermindert.



**Abbildung 38: Schema der Selbstlimitierung einer Th1 Zell vermittelten ZNS Entzündung**  
 Durch die Sekretion von IFN- $\gamma$  induzieren Th1 Zellen im ZNS die Expression von IDO in Mikroglia/Makrophagen und starten somit den Kynureninweg, was zu einer lokalen Verarmung an Tryptophan und der Synthese von toxischen Tryptophanabbauprodukten führt. Gleichzeitig induziert IFN- $\gamma$  die Expression des Todesliganden CD95L auf Astrozyten. Im ZNS induzieren aktivierte Th1 Zellen demnach 3 antiinflammatorische Mechanismen, die eine Fortschreiten der Entzündung unterdrücken.

Anhand der vorliegenden Arbeit konnte die Beteiligung der IDO als immunregulatorisches Enzym während autoimmuner ZNS Entzündung belegt werden. In folgenden Arbeiten sollen in der EAE zunächst die hier bereits beschriebenen am Kynureninweg beteiligten Enzyme wie die Kynurinase die 3-Hydroxyanthranilatoxidase in Bezug auf Ihre Expression und Aktivität hin untersucht werden. Ebenfalls soll die Akkumulation einzelner Tryptophanmetabolite in MS Patienten in Abhängigkeit des Erkrankungsstadiums untersucht werden. Ziel ist es, durch eine bessere Kenntnis der Wirkung einzelner Schritte des Kynureninweges und der immunologischen Wirkung entstehender Metabolite Ansätze für ergänzende Behandlungsmethoden zentralnervöser Autoimmunerkrankungen wie der MS zu identifizieren.

# Abkürzungsverzeichnis

3H-ase3-Hydroxyanthranilatoxidase

AIDS erworbenes Immundefizienz Syndrom

BBB Bluthirnschranke

CAM Zell Adhäsions Molekül

CD Cluster of Differentiation

CFA komplettes Freundesches Adjuvanz

CT Zyklenschwellwert (cycle threshold)

DAB Diaminobenzidin (3,4,3',4'-Tetraaminobi-phenyltetrahydrochlorid)

DMEM Dulbecco's modifiziertes Eagle Medium

DNA Desoxyribonukleinsäure

EAE experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis

FKS fetales Kälberserum

GAPDH Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase

GFAP saures fibrilläres Astrozytenprotein

GFP grün fluoreszierendes Protein

GFS-IB4 Griffonia simplyfolia Isolektin B4

HBSS Hank's balanced Salt Solution

HIV Humanes Immundefizienzvirus

HPLC hochauflösende Flüssigkeitschromatografie

Iba1 ionisiertes Calcium-bindendes Adaptormolekül 1

IDO Indolamin 2,3- Dioxygenase

IFN- $\gamma$  Interferon-gamma

IL Interleukin

iNOS induzierbare Stickstoffmonoxid Synthetase

K-ase Kynurinase

Kyn Kynurenin

LFA Leukozyten Funktions-assoziiertes Antigen

LPS Lipopolysacharid  
 MBP basisches Myelinprotein  
 MHC Haupt-Histokompatibilitätskomplex  
 MOG Myelin Oligodendrozyten Protein  
 mRNA Boten-Ribonukleinsäure  
 MS Multiple Sklerose  
 NBM Beuro-Basalmedium  
 NO Stickstoffmonoxid  
 PAGE Polyacrylamid-Gelelektrophorese  
 PB Phosphatpuffer  
 PBS Phosphat-gepufferte Salzlösung  
 PCR Polymerasekettenreaktion  
 PLL Poly-L-Lysin  
 PLP Proteolipidprotein  
 PSGL P-Selektin Glykoprotein Ligand  
 RNA Ribonukleinsäure  
 rRNA ribosomale Ribonukleinsäure  
 RT-PCR revers transkribierte Polymerasekettenreaktion  
 STAT Signal Transducer and Activator of Transkription  
 TDO Tryptophan 2,3-Dioxygenase  
 TGF- $\beta$  transformierender Wachstumsfaktor-beta  
 Th-Zellen T Helferzellen  
 TNF- $\alpha$  Tumornekrosefaktor-alpha  
 tRNA Translations-Ribonukleinsäure  
 trp Tryptophan  
 UpM Umdrehungen pro Minute  
 ZNS zentrales Nervensystem



## Literaturverzeichnis

- Alderson MR, Tough TW, Braddy S, Davis-Smith T, Roux E, Schooley K, Miller RE, Lynch DH. Regulation of apoptosis and T cell activation by Fas-specific mAb. *Int Immunol.* 1994; *6(11)*:1799-806.
- Alexander AM, Crawford M, Bertera S, Rudert WA, Takikawa O, Robbins PD, Trucco M. Indoleamine 2,3-dioxygenase expression in transplanted NOD Islets prolongs graft survival after adoptive transfer of diabetogenic splenocytes. *Diabetes.* 2002; *51(2)*:356-65.
- Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol.* 1998; *160(10)*:4671-80.
- Alun Brown K. Factors modifying the migration of lymphocytes across the blood-brain barrier. *Int. Immunopharmacol.* 2001; *1*, 2043-2062.
- Altman J. Microglia emerge from the fog. *Trends Neurosci.* 1994; *17(2)*:47-9.
- Aschner M., Allen JW, Kimelberg HK, LoPachin RM, Streit WJ. Glial cells in neurotoxicity development. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1999; *39*, 151-173.
- Baird MA, Hart DN, Abernethy N, Watson JD. Dendritic cell presentation of PPD and 19 kDa protein of *Mycobacterium tuberculosis* and emergent T helper cell phenotype. *Immunol Cell Biol.* 1995; *73(6)*:537-43.
- Banati RB, Gehrman J, Schubert P, Kreutzberg GW. Cytotoxicity of microglia. *Glia* 1993; *7*: 111-118.
- Bauer J, Huitinga I, Zhao W, Lassmann H, Hickey WF, Dijkstra CD. The role of macrophages, perivascular cells, and microglial cells in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Glia.* 1995; *15(4)*:437-46.
- Bauer TM, Jiga LP, Chuang JJ, Randazzo M, Opelz G, Terness P. Studying the immunosuppressive role of indoleamine 2,3-dioxygenase: tryptophan metabolites suppress rat allogeneic T-cell responses in vitro and in vivo. *Transpl Int.* 2005; *18(1)*:95-100.
- Beatty WL, Belanger TA, Desai AA, Morrison RP, Byrne GI. Tryptophan depletion as a mechanism of gamma interferon-mediated chlamydial persistence. *Infect Immun.* 1994; *62(9)*:3705-11.
- Barcelo-Batllori S, Andre M, Servis C, Levy N, Takikawa O, Michetti P, Reymond M, Felley-Bosco E. Proteomic analysis of cytokine induced proteins in human intestinal epithelial cells: implications for inflammatory bowel diseases. *Proteomics.* 2002; *2(5)*:551-60.

Bechmann I, Nitsch R. Astrocytes and microglial cells incorporate degenerating fibers following entorhinal lesion: a light, confocal, and electron microscopical study using a phagocytosis-dependent labeling technique. *Glia*. 1997;20(2):145-54.

Bechmann I, Mor G, Nilsen J, Eliza M, Nitsch R, Naftolin F. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia*. 1999; 27(1):62-74.

Bechmann I, Lossau S, Steiner B, Mor G, Gimsa U, Nitsch R. Reactive astrocytes upregulate Fas (CD95) and Fas ligand (CD95L) expression but do not undergo programmed cell death during the course of anterograde degeneration. *Glia*. 2000;32(1):25-41.

A) Bechmann I, Peter S, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R. Presence of B7-2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *FASEB J*. 2001; 15(6):1086-8.

B) Bechmann I, Kwidzinski E, Kovac AD, Simburger E, Horvath T, Gimsa U, Dirnagl U, Priller J, Nitsch R. Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol*. 2001; 168(2):242-9.

Bechmann I, Nitsch R. Plasticity following lesion: help and harm from the immune system. *Restor Neurol Neurosci*. 2001; 19(3-4):189-98.

Bechmann I, Steiner B, Gimsa U, Mor G, Wolf S, Beyer M, Nitsch R, Zipp F. Astrocyte-induced T cell elimination is CD95 ligand dependent. *J Neuroimmunol*. 2002; 132(1-2): 60-5.

Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, Kwidzinski E, Simburger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J*. 2005; 19(6):647-9. Epub 2005 Jan 25.

Bellgrau D, Gold D, Selawry H, Moore J, Franzusoff A, Duke RC. A role for CD95 ligand in preventing graft rejection. *Nature*. 1995; 377(6550):630-2.

Benveniste EN. Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med*. 1997; 75(3):165-73.

Bernard CC, Leydon J, Mackay IR. T cell necessity in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Eur J Immunol*. 1976; 6(9): 655-60.

Begolka WS, Vanderlugt CL, Rahbe SM, Miller SD. Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. *J Immunol*. 1998;161(8):4437-46.

Boado RJ, Li JY, Nagaya M, Zhang C, Pardridge WM. Selective expression of the large neutral amino acid transporter at the blood-brain barrier. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999; 96(21):12079-84.



- Bonetti B, Pohl J, Gao YL, Raine CS. Cell death during autoimmune demyelination: effector but not target cells are eliminated by apoptosis. *J Immunol.* 1997; *159(11)*:5733-41.
- Brabb T, Goldrath AW, von Dassow P, Paez A, Liggitt HD, Goverman J. Triggers of autoimmune disease in a murine TCR-transgenic model for multiple sclerosis. *J Immunol.* 1997; *159(1)*:497-507.
- Branchey L, Weinberg U, Branchey M, Linkowski P, Mendlewicz J. Simultaneous study of 24-hour patterns of melatonin and cortisol secretion in depressed patients. *Neuropsychobiology.* 1982;*8(5)*:225-32.
- Brosnan CF, Cannella B, Battistini L, Raine CS. Cytokine localization in multiple sclerosis lesions: correlation with adhesion molecule expression and reactive nitrogen species. *Neurology.* 1995; *45(6 Suppl 6)*:16-21.
- Brown KA. Factors modifying the migration of lymphocytes across the blood-brain barrier. *Int Immunopharmacol.* 2001; *1(12)*:2043-62.
- Bruck W, Lucchinetti C, Lassmann H. The pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2002; *8(2)*:93-7.
- von Bubnoff D, Matz H, Frahnert C, Rao ML, Hanau D, de la Salle H, Bieber T. FcεpsilonRI induces the tryptophan degradation pathway involved in regulating T cell responses. *J Immunol.* 2002; *169(4)*:1810-6.
- Calabrese V, Bates TE, Stella AM. NO synthase and NO-dependent signal pathways in brain aging and neurodegenerative disorders: the role of oxidant/antioxidant balance. *Neurochem Res.* 2000;*25(9-10)*:1315-41.
- Cannella B, Cross AH, Raine CS. Anti-adhesion molecule therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1993; *46(1-2)*:43-55.
- Cannella B, Raine CS. The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol.* 1995;*37(4)*:424-35.
- Carlin JM, Borden EC, Sondel PM, Byrne GI. Interferon-induced indolamine 2,3- dioxygenase activity in human mononuclear phagocytes. *J. Leukoc Biol.* 1989;*45(1)*:29-34.
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia.* 1998; *22(1)*:72-85.
- Chan A, Magnus T, Gold R. Phagocytosis of apoptotic inflammatory cells by microglia and modulation by different cytokines: mechanism for removal of apoptotic cells in the inflamed nervous system. *Glia.* 2001; *33(1)*:87-95.

Chavarria A, Alcocer-Varela J. Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmun Rev.* 2004; 3(4):251-60.

Choi C, Park JY, Lee J, Lim JH, Shin EC, Ahn YS, Kim CH, Kim SJ, Kim JD, Choi IS, Choi IH. Fas ligand and Fas are expressed constitutively in human astrocytes and the expression increases with IL-1, IL-6, TNF-alpha, or IFN-gamma. *J Immunol.* 1999; 162(4):1889-95.

Cross AH, O'Mara T, Raine CS. Chronologic localization of myelin-reactive cells in the lesions of relapsing EAE: implications for the study of multiple sclerosis. *Neurology.* 1993;43(5):1028-33.

Cserr HF, Knopf PM. Cervical lymphatics, the blood-brain barrier and the immunoreactivity of the brain: a new view. *Immunol Today.* 1992;13(12):507-12.

Currier AR, Ziegler MH, Riley MM, Babcock TA, Telbis VP, Carlin JM. Tumor necrosis factor-alpha an lipopolysaccharide enhances interferon-induced antichlamydial indoleamine dioxygenase activity independently. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; 20(4):369-76.

Daley-Yates PT, Powell AP, Smith LL. Pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase activity and its significance in the response of rats, mice, and rabbits to oxidative stress. *Toxicol Appl Pharmacol.* 1988;96(2):222-32.

Daubener W, Posdziech V, Hadding U, MacKenzie CR. Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med Microbiol Immunol.* 1999; 187(3):143-7.

Daubener W, MacKenzie CR. IFN-gamma activated indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human cells is an antiparasitic and an antibacterial effector mechanism. *Adv Exp Med Biol.* 1999; 467:517-24.

Dean G, Kurtzke JF. On the risk of multiple sclerosis according to age at immigration to South Africa. *Br Med J.* 1971; 3(777):725-9.

De Keyser J, Zeinstra E, Frohman E. Are astrocytes central players in the pathophysiology of multiple sclerosis? *Arch Neurol.* 2003;60(1):132-6.

Depboylu C, Reinhart TA, Takikawa O, Imai Y, Maeda H, Mitsuya H, Rausch D, Eiden LE, Weihe E. Brain virus burden and indoleamine-2,3-dioxygenase expression during lentiviral infection of rhesus monkey are concomitantly lowered by 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine. *Eur J Neurosci.* 2004;19(11):2997-3005.

Diestel A, Aktas O, Hackel D, Hake I, Meier S, Raine CS, Nitsch R, Zipp F, Ullrich O. Activation of microglial poly(ADP-ribose)-polymerase-1 by cholesterol breakdown products during neuroinflammation: a link between demyelination and neuronal damage. *J Exp Med.* 2003;198(11):1729-40.

Dong Y, Benveniste EN. Immune function of astrocytes. *Glia.* 2001;36(2):180-90.

Drejer J, Larsson OM, Kvamme E, Svenneby G, Hertz L und Schousboe A. Ontogenetic development of glutamate metabolizing enzymes in cultured cerebellar granule cells and in cerebellum in vivo. *Neurochem.Res.* 1985; 10:49-62.

- Du MX, Sotero-Esteve WD, Taylor MW. Analysis of transcription factors regulating induction of indoleamine 2,3-dioxygenase by IFN-gamma. *J Interferon Cytokine Res.* 2000;20(2):133-42.
- Ebers GC, Bulman DE, Sadovnick AD, Warren S, Hader W, Murray TJ, Seland TP, Duquette P, Grey T. A population-based study of multiple sclerosis in twins. *N Engl J Med.* 1986; 315:1638-1642.
- Epplen C, Jackel S, Santos EJ, D'Souza M, Poehlau D, Dotzauer B, Sindern E, Haupts M, Rude KP, Weber F, Stover J, Poser S, Gehler W, Malin JP, Przuntek H, Epplen JT. Genetic predisposition to multiple sclerosis as revealed by immunoprinting. *Ann Neurol.* 1997; 41(3):341-52.
- Espey MG, Moffett JR, Namboodiri MA. Temporal and spatial changes of quinolinic acid immunoreactivity in the immune system of lipopolysaccharide-stimulated mice. *J Leukoc Biol.* 1995;57(2):199-206.
- Espey MG, Namboodiri MA. Selective metabolism of kynurenine in the spleen in the absence of indoleamine 2,3-dioxygenase induction. *Immunol Lett.* 2000;71(1):67-72.
- (A) Fallarino F, Vacca C, Orabona C, Belladonna ML, Bianchi R, Marshall B, Keskin DB, Mellor AL, Fioretti MC, Grohmann U, Pucetti P. Functional expression of indoleamine 2,3- dioxygenase by murine CD8 alpha(+) dendritic cells. *Int. Immunol.* 2002;14(1):65-8.
- (B) Fallarino F, Grohmann U, Vacca C, Bianchi C, Orabona C, Spreca A, Fioretti MC, Pucetti P. T cell apoptosis by tryptophan catabolism. *Cell Death Differ.* 2002;9(10):1069-77.
- Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG. Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol.* 1996;156(1):5-7.
- Fillatreau S, Sweeney CH, McGeachy MJ, Gray D, Anderton SM. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat Immunol.* 2002;3(10):944-50.
- Flaris NA., Densmore TL, Molleston M. C. und Hickey W. F. Characterization of microglia and macrophages in the central nervous system of rats: definition of the differential expression of molecules using standard and novel monoclonal antibodies in normal CNS and in four models of parenchymal reaction. *Glia* 1993; 7, 34-40.
- Frei K, Eugster HP, Bopst M, Constantinescu CS, Lavi E, Fontana A. Tumor necrosis factor alpha and lymphotoxin alpha are not required for induction of acute experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1997;185(12):2177-82.
- Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med.* 2002; 196(4):459-68.
- Fleckner J, Martensen PM, Tolstrup AB, Kjeldgaard NO, Justesen J. Differential regulation of the human, interferon inducible tryptophanyl-tRNA synthetase by various cytokines in cell lines. *Cytokine.* 1995; 7(1):70-7.
- (A) Flügel A, Bradl M. New tools to trace populations of inflammatory cells in the CNS. *Glia* 2001; 36(2):125-36.

(B) Flügel A, Berkowicz T, Ritter T, Labeur M, Jenne DE, Li Z, Ellwart JW, Willem M, Lassmann H, Wekerle H. Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity*. 2001; *14*(5):547-60.

Freund-J, Stern-ER, Pisani-TM Isoallergic encephalomyelitis and radiculitis in guinea pigs after one injection of brain and mycobacteria in water-in-oil emulsion. *J. Immunol*. 1947; *57*: 179

Frumento G, Rotondo R, Tonetti M, Damonte G, Benatti U, Ferrara GB. Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Exp Med*. 2002;*196*(4):459-68.

Gehrmann J, Matsumoto Y, Kreutzberg G. W. Microglia: intrinsic immune effector cell of the brain. *Brain Res. Rev*. 1995; *20*, 269 -275.

Giulian D, Ingeman JE. Colony-stimulating factors as promoters of ameboid microglia. *J Neurosci*. 1988 ;*8*(12):4707-17.

Glabinski AR, Tani M, Strieter RM, Tuohy VK, Ransohoff RM. Synchronous synthesis of alpha- and beta-chemokines by cells of diverse lineage in the central nervous system of mice with relapses of chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*. 1997;*150*(2):617-30.

Gold R, Hartung HP, Toyka KV. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today*. 2000;*6*(2):88-91.

Goldstein LE, Leopold MC, Huang X, Atwood CS, Saunders AJ, Hartshorn M, Lim JT, Faget KY, Muffat JA, Scarpa RC, Chylack LT Jr, Bowden EF, Tanzi RE, Bush AI. 3-Hydroxykynurenine and 3-hydroxyanthranilic acid generate hydrogen peroxide and promote alpha-crystallin cross-linking by metal ion reduction. *Biochemistry*. 2000; *39*(24):7266-75.

Gorczyński RM, Hadidi S, Yu G, Clark DA. The same immunoregulatory molecules contribute to successful pregnancy and transplantation. *Am J Reprod Immunol*. 2002; *48*(1):18-26.

Gordon EJ, Myers KJ, Dougherty JP, Rosen H, Ron Y. Both anti-CD11a (LFA-1) and anti-CD11b (MAC-1) therapy delay the onset and diminish the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1995;*62*(2):153-60.

Graeber MB, Streit WJ, Buringer D, Sparks DL, Kreutzberg GW. Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II perivascular cells in histologically normal human brain. *J. Neuropathol. Exp. Neurol*. 1992; *51*, 303-311.

Gray LS, Huber KS, Gray MC, Hewlett EL, Engelhard VH. Pertussis toxin effects on T lymphocytes are mediated through CD3 and not by pertussis toxin catalyzed modification of a G protein. *J Immunol*. 1989;*142*(5):1631-8.

Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science*. 1995; *270*(5239):1189-92.

- Guillemin GJ, Kerr SJ, Pemberton LA, Smith DG, Smythe GA, Armati PJ, Brew BJ. IFN-beta1b induces kynurenine pathway metabolism in human macrophages: potential implications for multiple sclerosis treatment. *J Interferon Cytokine Res.* 2001; *21(12)*:1097-101.
- Guillemin GJ, Brew BJ. Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol.* 2004; *75(3)*:388-97.
- Guillemin GJ, Smythe G, Takikawa O, Brew BJ. Expression of indoleamine 2,3-dioxygenase and production of quinolinic acid by human microglia, astrocytes, and neurons. *Glia*:2004, published online
- Hao C, Richardson A, Federoff S. Macrophage-like cells originate from neuroepithelium in culture: characterization and properties of the macrophage-like cells. *Int. J. Dev. Neurosci.* 1991; *9*, 1-14.
- Hart DN. Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response. *Blood* 1997; *90*, 3245-3287.
- Hayashi T, Beck L, Rossetto C, Gong X, Takikawa O, Takabayashi K, Broide DH, Carson DA, Raz E. Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J. Clin. Invest.* 2004; *114*: 270-279.
- Hayes GM, Woodroffe MN, und Cuzner ML. Microglia are the major cell type expressing MHC class II in human white matter. *J. Neurol. Sci.* 1987; *80*, 25-37.
- Heyes MP, Saito K, Crowley JS, Davis LE, Demitrack MA, Der M, Dilling LA, Elia J, Kruesi MJ, Lackner A. Quinolinic acid and kynurenine pathway metabolism in inflammatory and non-inflammatory neurological disease. *Brain.* 1992; *115 ( Pt 5)*:1249-73.
- Heyes MP, Achim CL, Wiley CA, Major EO, Saito K, Markey SP. Human microglia convert l-tryptophan into the neurotoxin quinolinic acid. *Biochem J.* 1996; *320 ( Pt 2)*:595-7.
- Heyes MP, Saito K, Lackner A, Wiley CA, Achim CL, Markey SP. Sources of the neurotoxin quinolinic acid in the brain of HIV-1-infected patients and retrovirus-infected macaques. *FASEB J.* 1998; *12(10)*:881-96.
- Heyes MP, Ellis RJ, Ryan L, Childers ME, Grant I, Wolfson T, Archibald S, Jernigan TL Elevated cerebrospinal fluid quinolinic acid levels are associated with region-specific cerebral volume loss in HIV infection. *Brain.* 2001; *124(Pt 5)*:1033-42
- Hickey WF, Hsu BL, Kimura H. T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J Neurosci Res.* 1991; *28(2)*:254-60.
- Higuchi K, Kuno S, Hayaishi O. Enzymic formation of D-kynurenine, *Fed. Proc.* 1963; *22*:243.
- Himmelweit F. (1956–1960) *Collected Papers of Paul Ehrlich* (Pergamon, London).
- Hisahara S, Okano H, Miura M. Caspase-mediated oligodendrocyte cell death in the pathogenesis of autoimmune demyelination. *Neurosci Res.* 2003; *46(4)*:387-97.

- Hucke C, MacKenzie CR, Adjogble KD, Takikawa O, Daubener W. Nitric oxide-mediated regulation of gamma interferon-induced bacteriostasis: inhibition and degradation of human indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun*. 2004; 72(5):2723-30.
- Huitinga I, van Rooijen N, de Groot CJ, Uitdehaag BM, Dijkstra CD. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med*. 1990;172(4):1025-33.
- Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, Fischer JS, Goodkin DE, Granger CV, Simon JH. A phase III trial of intramuscular recombinant interferon beta as treatment for exacerbating-relapsing multiple sclerosis: design and conduct of study and baseline characteristics of patients. Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Mult Scler*. 1995; 1(2):118-35.
- Janssens S, Beyaert R. Role of Toll-like receptors in pathogen recognition. *Clin Microbiol Rev*. 2003;16(4):637-46.
- Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-relapsing multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1995; 45(7):1268-76.
- Juedes AE, Ruddle NH. Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2001;166(8):5168-75.
- Kai S, Goto S, Tahara K, Sasaki A, Kawano K, Kitano S. Inhibition of indoleamine 2,3-dioxygenase suppresses NK cell activity and accelerates tumor growth. *J Exp Ther Oncol*. 2003; 3(6):336-45.
- Kamradt T, Mitchison NA. Tolerance and autoimmunity. *N Engl J Med* 2001; 344(9):655-64
- Kang JA, Mohindru M, Kang BS, Park SH, Kim BS. Clonal expansion of infiltrating T cells in the spinal cords of SJL/J mice infected with Theiler's virus. *J Immunol*. 2000; 165(1):583-90.
- Kennedy MK, Torrance DS, Picha KS, Mohler KM. Analysis of cytokine mRNA expression in the central nervous system of mice with experimental autoimmune encephalomyelitis reveals that IL-10 mRNA expression correlates with recovery. *J Immunol*. 1992; 149(7):2496-505.
- Kerfoot SM, Kubes P. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2002;169(2):1000-6.
- Kitamura T, Miyake T, Fujita S. Genesis of resting microglia in the gray matter of mouse hippocampus. *J. Comp. Neurol*. 1984; 226, 421-433.
- Kohji T, Matsumoto Y. Coexpression of Fas/FasL and Bax on brain and infiltrating T cells in the central nervous system is closely associated with apoptotic cell death during autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2000;106(1-2):165-71.
- Kreutzberg GW. Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci*. 1996; 19, 312-318.

- Kurtzke JF. MS epidemiology world wide. One view of current status. *Acta Neurol Scand Suppl.* 1995;*161*:23-33.
- Kwidzinski E, Mutlu LK, Kovac AD, Bunse J, Goldmann J, Mahlo J, Aktas O, Zipp F, Kamradt T, Nitsch R, Bechmann I. Self-tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model. *J Neural Transm Suppl.* 2003;*65*:29-49
- Kwidzinski E, Bunse J, Aktas O, Richter D, Mutlu L, Zipp F, Nitsch R, Bechmann I. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and downregulates autoimmune inflammation. *FASEB* in press
- Laatsch RH., Kies MW, Gordon S, Alvord EC. The encephalitogenic activity of myelin isolated by ultracentrifugation. *J. Exp. Med.* 1962; *115*: 777–778.
- Laich A, Neurauter G, Widner B, Fuchs D. More rapid method for simultaneous measurement of tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clin Chem.* 2002; *48*(3):579-81.
- Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Grodon S. Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 1990; *39*, 151-170.
- Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF. Bone marrow derived elements and microglia in brain inflammation. *Glia* 1993; *7*, 19-24.
- Lee SC, Moore GR, Golenwsky G, Raine CS. Multiple sclerosis: a role for astroglia in active demyelination suggested by class II MHC expression and ultrastructural study. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1990;*49*(2):122-36.
- Lee GK, Park HJ, Macleod M, Chandler P, Munn DH, Mellor AL. Tryptophan deprivation sensitizes activated T cells to apoptosis prior to cell division. *Immunology* 2002; *107*(4):452-60
- Liedtke W, Edelmann W, Chiu FC, Kucherlapati R, Raine CS. Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking glial fibrillary acidic protein is characterized by a more severe clinical course and an infiltrative central nervous system lesion. *Am J Pathol.* 1998;*152*(1):251-9.
- Ling EA, Wong WC. The origin and nature of ramified and amoeboid microglia: a historical review and current concepts. *Glia* 1993; *7*:9-18.
- Linington C, Berger T, Perry L, Weerth S, Hinze-Selch D, Zhang Y, Lu HC, Lassmann H, Wekerle H. T cells specific for the myelin oligodendrocyte glycoprotein mediate an unusual autoimmune inflammatory response in the central nervous system. *Eur J Immunol.* 1993; *23*(6):1364-72.
- Linthicum DS, Munoz JJ, Blaskett A. Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of *Bordetella pertussis* is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system. *Cell Immunol.* 1982; *73*(2):299-310.
- Lublin F, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: Results of an international survey. *Neurology* 1996; *46*, 907-911.

- Martin R, Jaraquemada D, Flerlage M, Richert J, Whitaker J, Long EO, McFarlin DE, McFarland HF. Fine specificity and HLA restriction of myelin basic protein-specific cytotoxic T cell lines from multiple sclerosis patients and healthy individuals. *J Immunol.* 1990;145(2):540-8.
- Medawar PB. Immunity to homologous grafted skin. The fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British J.Exp.Pathol.* 1948; 29:58-69.
- Mellor AL, Baban B, Chandler P, Marshall B, Jhaver K, Hansen A, Koni PA, Iwashima M, Munn DH. Cutting edge: induced indoleamine 2,3 dioxygenase expression in dendritic cell subsets suppresses T cell clonal expansion. *J Immunol.* 2003; 171(4): 1652-5.
- Miki T, Sun H, Lee Y, Tandin A, Kovscek AM, Subbotin V, Fung JJ, Valdivia LA. Blockade of tryptophan catabolism prevents spontaneous tolerogenicity of liver allografts. *Transplant Proc.* 2001; 33(1-2):129-30.
- Minagar A, Alexander JS. Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2003; 9(6):540-9.
- Moffett JR, Namboodiri MA. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol.* 2003; 81(4):247-65.
- Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol.* 1989;7:145-73.
- Moore S, Thanos S. The concept of microglia in relation to central nervous system disease and regeneration. *Prog.Neurobiol.* 1996; 48:441-460.
- Munn DH, Zhou M, Attwood JT, Bondarev I, Conway SJ, Marshall B, Brown C, Mellor AL. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 1998;281(5380):1122-4.
- Munn DH, Shafizadeh E, Attwood JT, Bondarev I, Pashine A, Mellor AL. Inhibition of T cell proliferation by macrophage tryptophan catabolism. *J Exp Med.* 1999; 189(9):1363-72.
- Munn DH, Sharma MD, Lee JR, Jhaver KG, Johnson TS, Keskin DB, Marshall B, Chandler P, Antonia SJ, Burgess R, Slingluff CL Jr, Mellor AL. Potential regulatory function of human dendritic cells expressing indoleamine 2,3-dioxygenase. *Science.* 2002;297(5588):1867-70.
- Muraro PA, Bonanni L, Mazzanti B, Pantalone A, Traggiai E, Massacesi L, Vergelli M, Gambi D. Short-term dynamics of circulating T cell receptor V beta repertoire in relapsing-remitting MS. *J Neuroimmunol.* 2002; 127(1-2):149-59.
- Nagineni CN, Pardhasaradhi K, Martins MC, Detrick B, Hooks JJ. Mechanisms of interferon-induced inhibition of *Toxoplasma gondii* replication in human retinal pigment epithelial cells. *Infect Immun.* 1996; 64(10):4188-96.
- Nakamura Y. Regulating factors for microglial activation. *Biol Pharm Bull.* 2002;25(8):945-53.
- Nettelbreker E, Zeidler H, Bartels H, Dreses-Werringloer U, Daubener W, Holtmann H, Kohler L. Studies of persistent infection by *Chlamydia trachomatis* serovar K in TPA-differentiated U937 cells and the role of IFN-gamma. *J Med Microbiol.* 1998;47(2):141-9.



Olerup O, Hillert J. HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation. *Tissue Antigens*. 1991;38(1):1-15.

Ohmori K, Hong Y, Fujiwara M, Matsumoto Y. In situ demonstration of proliferating cells in the rat central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence suggesting that most infiltrating T cells do not proliferate in the target organ. *Lab Invest*. 1992; 66(1):54-62.

Okuda Y, Sakoda S, Fujimura H, Yanagihara T. Nitric oxide via an inducible isoform of nitric oxide synthase is a possible factor to eliminate inflammatory cells from the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1997;73(1-2):107-16.

Pender MP, Wolfe NP. Prevention of autoimmune attack and disease progression in multiple sclerosis: current therapies and future prospects. *Intern Med J*. 2002; 32(11):554-63.

Penkowa M, Espejo C, Martinez-Caceres EM, Poulsen CB, Montalban X, Hidalgo J. Altered inflammatory response and increased neurodegeneration in metallothionein I+II deficient mice during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2001;119(2):248-60.

Petry KG, Boullerne AI, Pousset F, Brochet B, Caille JM, Dousset V. Experimental allergic encephalomyelitis animal models for analyzing features of multiple sclerosis. *Pathol Biol (Paris)*. 2000; 48(1):47-53.

Pette M, Pette DF, Muraro PA, Farnon E, Martin R, McFarland HF. Interferon-beta interferes with the proliferation but not with the cytokine secretion of myelin basic protein-specific, T-helper type 1 lymphocytes. *Neurology*. 1997;49(2):385-92.

Pettinelli CB, McFarlin DE. Adoptive transfer of experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice after in vitro activation of lymph node cells by myelin basic protein: requirement for Lyt 1+ 2- T lymphocytes. *J Immunol*. 1981; 127(4):1420-3.

Pfefferkorn ER. Interferon gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cell to degrade tryptophan. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 1984; 81:908-12.

Piccio L, Rossi B, Scarpini E, Laudanna C, Giagulli C, Issekutz AC, Vestweber D, Butcher EC, Constantin G. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *J Immunol*. 2002; 168(4):1940-9.

Pozzilli C, Marinelli F, Romano S, Bagnato F. Corticosteroids treatment. *J Neurol Sci*. 2004;223(1):47-51.

Priller J, Flugel A, Wehner T, Boentert M, Haas CA, Prinz M, Fernandez-Klett F, Prass K, Bechmann I, de Boer BA, Frotscher M, Kreutzberg GW, Persons DA, Dirnagl U. Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nat Med*. 2001;7(12):1356-61.

Ransohoff RM, Hamilton TA, Tani M, Stoler MH, Shick HE, Major JA, Estes ML, Thomas DM, Tuohy VK. Astrocyte expression of mRNA encoding cytokines IP-10 and JE/MCP-1 in experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J*. 1993;7(6):592-600.

- Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2003; 3(7):569-81.
- Rappert A, Bechmann I, Pivneva T, Mahlo J, Biber K, Nolte C, Kovac AD, Gerard C, Boddeke HW, Nitsch R, Kettenmann H. CXCR3-dependent microglial recruitment is essential for dendrite loss after brain lesion. *J Neurosci.* 2004;24(39):8500-9.
- Rausch DM, Heyes MP, Murray EA, Lendvay J, Sharer LR, Ward JM, Rehm S, Nohr D, Weihe E, Eiden LE. Cytopathologic and neurochemical correlates of progression to motor/cognitive impairment in SIV-infected rhesus monkeys. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1994;53(2):165-75.
- Reese TS, Karnovsky M.J. Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase. *J. Cell. Biol* 1967; 34, 207-217.
- Richardson A, Hao C, Federoff S. Microglia progenitor cells: a subpopulation in cultures of mouse neopallial astroglia. *Glia* 1993; 7, 25-33.
- Ridet JL, Malhotra SK, Privat A, Gage FH. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 1997;20(12):570-7.
- Rio-Hortega PD. Microglia. In: *Cytology and Cellular Pathology of the Nervous System* (Penfield W. ed), 1932; 483-534. New York: Hafner Publishing Company.
- Rivers TM, Sprunt, DH, Berry GP. Observations on attempts to produce acute disseminated encephalomyelitis in monkeys. *Journal of Experimental Medicine* 1933; 58; 39-53.
- Robinson CM, Shire KA, Carlin JM. Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$ . *J. Interferon Cytokine Res.* 2003; 23(8):413-21.
- Sabelko-Downes KA, Cross AH, Russell JH. Dual role for Fas ligand in the initiation of and recovery from experimental allergic encephalomyelitis. *J Exp Med.* 1999;189(8):1195-205.
- Saito K, Nagamura Y, Ohta Y, Sasaki E, Ishiguro I. Characterization of the L-tryptophan transport system in the liver of growing rats. *Life Sci.* 1991; 49(7):527-34.
- Sakurai K, Zou JP, Tschetter JR, Ward JM, Shearer GM. Effect of indoleamine 2,3-dioxygenase on induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 2002; 129(1-2):186-96.
- Samoilova EB, Horton JL, Hilliard B, Liu TS, Chen Y. IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells. *J Immunol.* 1998;161(12):6480-6.
- Sanni LA, Thomas SR, Tattam BN, Moore DE, Chaudhri G, Stocker R, Hunt NH. Dramatic changes in oxidative tryptophan metabolism along the kynurenine pathway in experimental cerebral and noncerebral malaria. *Am J Pathol.* 1998;152(2):611-9.

Sarsero JP, Merino E, Yanofsky C.A. *Bacillus subtilis* operon containing genes of unknown function senses tRNA<sup>Trp</sup> charging and regulates expression of the genes of tryptophan biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; *97*(6):2656-61.

Schmied M, Breitschopf H, Gold R, Zischler H, Rothe G, Wekerle H, Lassmann H. Apoptosis of T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis. Evidence for programmed cell death as a mechanism to control inflammation in the brain. *Am J Pathol*. 1993; *143*(2):446-52.

Schroten H, Spors B, Hucke C, Stins M, Kim KS, Adam R, Daubener W. Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics*. 2001; *32*(4):206-10.

Schwarcz R, Pellicciari R. Manipulation of brain kynurenines: glial targets, neuronal effects, and clinical opportunities. *J Pharmacol Exp Ther*. 2002; *303*(1):1-10.

Sei S, Saito K, Stewart SK, Crowley JS, Brouwers P, Kleiner DE, Katz DA, Pizzo PA, Heyes MP. Increased human immunodeficiency virus (HIV) type 1 DNA content and quinolinic acid concentration in brain tissues from patients with HIV encephalopathy. *J Infect Dis*. 1995; *172*(3):638-47.

Selmaj K, Raine CS, Farooq M, Norton WT, Brosnan CF. Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol*. 1991; *147*(5):1522-9.

Serafini B, Columba-Cabezas S, Di Rosa F, Aloisi F. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am J Pathol*. 2000; *157*(6):1991-2002.

Shirai Y. On the transplantation of the rat sarcoma in adult heterogenous animals. *Jpn. Med. World*. 1921; *1*(14):15.

Smith ME, Somera FP, Eng LF. Immunocytochemical staining for glial fibrillary acidic protein and the metabolism of cytoskeletal proteins in experimental allergic encephalomyelitis. *Brain Res*. 1983; *264*(2):241-53.

Smith ME, Eng LF. Glial fibrillary acidic protein in chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice. *J Neurosci Res*. 1987; *18*(1):203-8.

Smith ME, de Jong LJ. Antibody to myelin constituents: a possible factor in induction of cell-mediated demyelination. *Neurochem Res*. 1987; *12*(2):167-72.

Sobel RA, Tuohy VK, Lu ZJ, Laursen RA, Lees MB. Acute experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice induced by a synthetic peptide of myelin proteolipid protein. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1990; *49*(5):468-79.

Soldan SS, Berti R, Salem N, Secchiero P, Flamand L, Calabresi PA, Brennan MB, Maloni HW, McFarland HF, Lin HC, Patnaik M, Jacobson S. Association of human herpes virus 6 (HHV-6) with multiple sclerosis: increased IgM responses to HHV-6 early antigen and detection of serum HHV-6 DNA. *Nat Med*. 1997; *3*(12):1349-1397

Soos JM, Ashley TA, Morrow J, Patarroyo JC, Szente BE, Zamvil SS. Differential expression of B7 co-stimulatory molecules by astrocytes correlates with T cell activation and cytokine production. *Int Immunol.* 1999; *11*(7):1169-79.

Sotero-Esteva WD, Wolfe D, Ferris M, Taylor MW. An indoleamine 2,3-dioxygenase-negative mutant is defective in stat1 DNA binding: differential response to IFN-gamma and IFN-alpha. *J Interferon Cytokine Res.* 2000; *20*(7):623-32.

Spurkland A, Ronningen KS, Vandvik B, Thorsby E, Vartdal F. HLA-DQA1 and HLA-DQB1 genes may jointly determine susceptibility to develop multiple sclerosis. *Hum Immunol.* 1991; *30*(1):69-75.

Streilein JW. Immune privilege as the result of local tissue barriers and immunosuppressive microenvironments. *Curr Opin Immunol.* 1993; *5*(3):428-32.

Streit WJ, Graeber MB, Kreutzberg GW. Functional plasticity of microglia: a review. *Glia* 1988; *1*, 301-307.

Streit WJ, Kreutzberg GW. Response of endogenous glial cells to motor neuron degeneration induced by toxic ricin. *J. Comp. Neurol* 1988; *268*, 248-263.

Streit WJ, Kincaid Colton CA. The brain's immune system. *Sci. Am.* 1995; *273*.

Streit WJ. The role of microglia in brain injury. *Neurotoxicology.* 1996; *17*(3-4):671-8.

Streit WJ, Walter SA, Pennell NA. Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* 1999; *57*, 563-581.

Suter T, Malipiero U, Otten L, Ludewig B, Muelethaler-Mottet AMB, Reith W, Fontana A. Dendritic cells and differential usage of the MHC class II transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis. *Eur. J. Immunol.* 2000; *30*(3):794-802.

Suvannavejh GC, Dal Canto MC, Matis LA, Miller SD. Fas-mediated apoptosis in clinical remissions of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2000; *105*(2):223-31.

Tabi Z, McCombe PA, Pender MP. Apoptotic elimination of V beta 8.2+ cells from the central nervous system during recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis induced by the passive transfer of V beta 8.2+ encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol.* 1994; *24*(11):2609-17.

Tabi Z, McCombe PA, Pender MP. Antigen-specific down-regulation of myelin basic protein-reactive T cells during spontaneous recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis: further evidence of apoptotic deletion of autoreactive T cells in the central nervous system. *Int Immunol.* 1995; *7*(6):967-73.

Taupin V, Renno T, Bourbonniere L, Peterson AC, Rodriguez M, Owens T. Increased severity of experimental autoimmune encephalomyelitis, chronic macrophage/microglial reactivity, and demyelination in transgenic mice producing tumor necrosis factor-alpha in the central nervous system. *Eur J Immunol.* 1997; *27*(4):905-13.

Terness P, Bauer TM, Rose L, Dufter C, Watzlik A, Simon H, Opelz G. Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites. *J Exp Med.* 2002; *196*(4):447-57.

- Thomas SR, Mohr D, Stocker R. Nitric oxide inhibits indoleamine 2,3-dioxygenase activity in Interferon-gamma-primed mononuclear phagocytes. *J. Biol. Chem.* 1994; 269:14457-14464.
- Tran EH, Hardin-Pouzet H, Verge G, Owens T. Astrocytes and microglia express inducible nitric oxide synthase in mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1997;74(1-2):121-9.
- Trotter JL, Pelfrey CM, Trotter AL, Selvidge JA, Gushleff KC, Mohanakumar T, McFarland HF. T cell recognition of myelin proteolipid protein and myelin proteolipid protein peptides in the peripheral blood of multiple sclerosis and control subjects. *J Neuroimmunol.* 1998;84(2):172-8.
- Tuohy VK, Lu Z, Sobel RA, Laursen RA, Lees MB. Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice. *J Immunol.* 1989; 142(5):1523-7.
- Uyttenhove C, Pilotte L, Theate I, Stroobant V, Colau D, Parmentier N, Boon T, Van den Eynde BJ. Evidence for a tumoral immune resistance mechanism based on tryptophan degradation by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Nat Med.* 2003; 9(10):1269-74.
- Vass K, Lassmann H. Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system. *Am J Pathol.* 1990;137(4):789-800.
- van der Veen RC, Trotter JL, Clark HB, Kapp JA. The adoptive transfer of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis with lymph node cells sensitized to myelin proteolipid protein. *J Neuroimmunol.* 1989;21(2-3):183-91.
- Verrey F, Jack DL, Paulsen IT, Saier MH Jr, Pfeiffer R. New glycoprotein-associated amino acid transporters. *J Membr Biol.* 1999; 172(3):181-92.
- Fanghänel J, Pera F, Anderhuber F, Nitsch R. *Anatomie des Menschen (Waldeyer )*, deGruyter Verlag. 2003; 355-363.
- Weller RO. Pathology of cerebrospinal fluid and interstitial fluid of the CNS: significance for Alzheimer disease, prion disorders and multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neuro.* 1998; 57, 885-894.
- Welsh CT, Rose JW, Hill KE, Townsend JJ. Augmentation of adoptively transferred experimental allergic encephalomyelitis by administration of a monoclonal antibody specific for LFA-1 alpha. *J Neuroimmunol.* 1993; 43(1-2):161-7.
- Wekerle H, Linington C, Lassmann H, Meyermann R. Cellular immune reactivity within the CNS. *Trend Neurosci.* 1986; 9:271-227.
- Wekerle H, Sun D, Oropeza-Wekerle RL, Meyermann R. Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J Exp Biol.* 1987; 132:43-57.
- Wekerle H. Experimental autoimmune encephalomyelitis as a model of immune-mediated CNS disease. *Curr Opin Neurobiol.* 1993; 3(5): 779-84.

- Wekerle H, Kojima K, Lannes-Vieira J, Lassmann H, Linington C. Animal models. *Ann Neurol.* 1994;36 Suppl:47-53.
- Widner B, Werner ER, Schennach H, Wachter H, Fuchs D. Simultaneous measurement of serum tryptophan and kynurenine by HPLC. *Clin Chem.* 1997; 43(12): 2424-6.
- Willer CJ, Ebers GC. Susceptibility to multiple sclerosis: interplay between genes and environment. *Curr Opin Neurol.* 2000; 13(3):241-7.
- Wirsching BA, Beninger RJ, Jhamandas K, Boegman RJ, Bialik M. Kynurenic acid protects against the neurochemical and behavioral effects of unilateral quinolinic acid injections into the nucleus basalis of rats. *Behav Neurosci.* 1989; 103(1):90-7.
- Wong GH, Bartlett PF, Clark-Lewis I, Battye F, Schrader JW. Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature.* 1984; 310(5979):688-91.
- Woodroffe MN, Hayes GM, Cuzner ML. Fc receptor density, MHC antigen expression and superoxide production are increased in interferon-gamma-treated microglia isolated from adult rat brain. *Immunology* 1989; 68, 421-426.
- Wu CH, Wen CY, Shieh JY, Ling EA. Down-regulation of membrane glycoprotein in amoeboid microglia transforming into ramified microglia in postnatal rat brain. *J. Neurocytol.* 1994; 23, 258-269.
- Wujek JR, Bjartmar C, Richer E, Ransohoff RM, Yu M, Tuohy VK, Trapp BD. Axon loss in the spinal cord determines permanent neurological disability in an animal model of multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2002; 61(1):23-32.
- Xie G, Bonner CA, Jensen RA. Dynamic diversity of the tryptophan pathway in chlamydiae: reductive evolution and a novel operon for tryptophan recapture. *Genome Biol.* 2002; 3(9): 51-56.
- Zamvil SS, Steinman L. The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis. *Annu Rev Immunol.* 1990; 8:579-621.
- Zeine R, Owens T. Loss rather than downregulation of CD4+ T cells as a mechanism for remission from experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1993; 44(2):193-8.
- Zielasek J, Hartung HP. Molecular mechanisms of microglial activation. *Adv. Neuroimmunol.* 1996; 6, 191.

## Eigene Publikationen

Alle Publikationen wurden an der medizinischen Fakultät der Charite erstellt.

Bechmann I, **Kwidzinski E**, Kovac AD, Simburger E, Horvath T, Gimsa U, Dirnagl U, Priller J, Nitsch R. Turnover of rat brain perivascular cells. *Exp Neurol*. 2001; 168(2):242-9.

Wolf SA, Fisher J, Bechmann I, Steiner B, **Kwidzinski E**, Nitsch R. Neuroprotection by T-cells depends on their subtype and activation state. *J Neuroimmunol*. 2002; 133(1-2):72-80.

**Kwidzinski E**, Mutlu LK, Kovac AD, Bunse J, Goldmann J, Mahlo J, Aktas O, Zipp F, Kamradt T, Nitsch R, Bechmann I. Self-tolerance in the immune privileged CNS: lessons from the entorhinal cortex lesion model. *J Neural Transm Suppl*. 2003; (65):29-49.

Kovac AD, **Kwidzinski E**, Heimrich B, Bittigau P, Deller T, Nitsch R, Bechmann I. Entorhinal cortex lesion in the mouse induces transsynaptic death of perforant path target neurons. *Brain Pathol*. 2004; 14(3):249-57.

Bechmann I, Goldmann J, Kovac AD, **Kwidzinski E**, Simburger E, Naftolin F, Dirnagl U, Nitsch R, Priller J. Circulating monocytic cells infiltrate layers of anterograde axonal degeneration where they transform into microglia. *FASEB J*. 2005; 19(6):647-9. Epub 2005 Jan 25.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden publiziert in:

**Kwidzinski E**, Bunse J, Aktas O, Richter D, Mutlu L, Zipp F, Nitsch R, Bechmann I. Indolamine 2,3-dioxygenase is expressed in the CNS and downregulates autoimmune inflammation. *FASEB* in press.

# Lebenslauf

Name: Kwidzinski

Vorname: Erik

Nationalität: deutsch

Geburtsdatum: 01.09.1972

Geburtsort: Berlin

Familienstand: ledig

Eltern: Kwidzinski Irmgard; Kwidzinski Gerd

## Schulausbildung:

Aug. 1979 bis Jun. 1985: Besuch der Münchhausengrundschule Berlin

Aug. 1985 bis Mai 1992: Humboldt Gymnasium Berlin

Abschluß: Abitur

## Hochschulausbildung:

Okt. 1992 bis Apr. 1999: Humboldt Universität zu Berlin, Studium der Biologie, Abschluß: Diplom Biologe

Seit Mrz. 2000: Promotion am Centrum für Anatomie, Institut für Zell- und Neurobiologie, Abt. Neuroimmunologie, Humboldt-Universität zu Berlin, Charité



## Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Ingo Bechmann, der es mir ermöglichte diese Arbeit in einer wissenschaftlich sehr anregenden Arbeitsatmosphäre anzufertigen. Seine Fähigkeit, auch aus scheinbaren Fehlschlägen einen positiven Wissensgewinn zu ziehen, in Kombination mit den zahlreichen oft bis in den frühen Morgen gehenden Diskussionen und Gespräche, bereicherten den oft frustrierenden Laboralltag in großem Maße.

Für die angenehme und anregende Atmosphäre möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Anatomie bedanken, die mir stets hilfsbereit zur Seite standen.

Daniel Richter teilte in den letzten 3 Jahren nicht nur das Büro mit mir, sondern sorgte neben seiner tatkräftigen Unterstützung im Labor auch dafür, dass ich musikalisch auf aktuellem Stand blieb. Jacqueline Mahlo brachte mir die Geheimnisse der Immunzytochemie bei, und verhalf mir im Squashcourt und beim Joggen zu ausgleichender körperlicher Bewegung. Susanne Wolf brachte mir zu Beginn meiner Promotion mit viel Geduld die Präparation und Kultivierung primärer Zellen bei.

Des weiteren möchte ich mich bei Adam Kovac, Jörg Bunse, Christine Brandt, Sabine Winkler und der ganzen Arbeitsgruppe von Prof. Bechmann bedanken, deren Arbeit miteinander als Team im Institut und außerhalb eine außerordentlich schöne Zeit während der letzten Jahre ermöglichte.

Bei Prof. Frauke Zipp, Prof. Robert Nitsch möchte ich mich für die fruchtbaren Diskussionen und die Bereitstellung ihrer Labore bedanken.

Unter der Anweisung von Orhan Aktas war es mir möglich die experimentelle autoimmune Enzephalomyelitis in unserem Institut zu etablieren. Hierfür möchte ich mich bei ihm bedanken und auch für seine sehr anregende Diskussionsbereitschaft.

Für die Hilfe bei administrativen/organisatorischen Problemen möchte ich mich bei Marni Pollrich und bei Kimberly Rosegger zusätzlich für die Korrekturen meiner in fehlerhaftem Englisch verfassten Schriftstücke bedanken.

Danken möchte ich an dieser Stelle auch meinen Freunden Thorsten Hentzelt, Markus Koch, Janek Kubelt und Helge Schröder, die stets ein offenes Ohr für meine Probleme hatten und im rechten Moment für Abwechslung sorgten.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und meiner Schwester Karen, die mich während der letzten Jahre in allen Lebenslagen unterstützt haben und es mir ermöglichten diese Arbeit anzufertigen.

Angelika Rappert möchte ich dafür danken, dass sie nicht nur durch sehr intensive Diskussionen zu der Entstehung dieser Arbeit beigetragen hat, sondern mich während der Anfertigung dieser Arbeit immer wieder aufgebaut und meine Launen ertragen hat.

## **EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich versichere an Eides statt, dass ich die vorliegende Dissertation selbst und ohne unzulässige Hilfe Dritter verfasst habe und die benutzten Hilfsmittel sowie die Literatur vollständig angegeben sind.

Berlin; den 4.01.2006

(Erik Kwidzinski)